
Lamininisoformen in humanen Speicheldrüsen und in ausgewählten Speicheldrüsentumoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.),
vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Hüllenhagen
geboren am 24.04.1977 in Nordhausen

Jena, 2002

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hartwig Kosmehl, Erfurt
2. Prof. Dr. Dr. Peter Hyckel, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Kriegsmann, Trier

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.04.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Definition und Komposition der extrazellulären Matrix	5
1.2. Die Basalmembran – Komposition, Struktur und Funktion	6
1.2.1. Komposition der Basalmembran	6
1.2.2. Struktur der Basalmembran	7
1.2.3. Funktion der Basalmembran.....	9
1.2.4. Basalmembranen in der Tumordiagnostik.....	11
1.3. Die Molekülfamilie der Laminine	12
1.3.1. Die Lamininisoformen – Nachweisverfahren, Aspekte der Gewebsverteilung und Struktur	13
1.3.2. Die Domänenstruktur der Laminine	16
1.3.3. Gewebliche Verteilung der Lamininisoformen – Perspektiven für die Tumordiagnostik.....	17
1.4. Klassifikation epithelialer Tumoren menschlicher Speicheldrüsen.....	19
1.5. Problemstellung	21
 2. Material und Methoden	 22
2.1. Gewebsmaterial	22
2.2. Kryokonservierung für immunhistochemische Verfahren	22
2.3. Paraffineinbettung / konventionelle Histologie	22
2.4. Immunhistochemische Technik - APAAP-Methode	23
2.5. Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierlösungen	24
2.5.1. Hämalan nach Meyer.....	24
2.5.2. PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung).....	24
2.5.3. TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung).....	24
2.5.4. 4% (5%, 10%) PBS-gepufferte Paraformaldehydlösung	25
2.5.5. 4% PBS-gepufferte Paraformaldehydlösung (RNase-frei)	25
2.5.6. Puffer für das APAAP-System.....	25
2.5.6.1. Tris-Puffer (1)	25
2.5.6.2. Verdünnungslösung für Primärantikörper.....	25

2.5.6.3. Verdünnungslösung für Brückenantikörper	25
2.5.6.4. Verdünnungslösung für APAAP-Komplex.....	26
2.5.6.5. Entwicklungslösung (100ml Ansatz)	26
2.6. Qualitative und semiquantitative Bewertungskriterien der Immunreaktionen für Basalmembranproteine und Differenzierungsmarker in gesunden Speicheldrüsen und Warthin-Tumoren	27
2.7. Qualitative Bewertungskriterien der Immunreaktionen für Basalmembranproteine und Differenzierungsmarker im pleomorphen Adenom.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich Histologie, Differenzierungsmarkern und Lamininketten in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse.....	29
3.1.1. Histologische Strukturen in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse	29
3.1.2. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Moleküle ASMA und Caldesmon im epithelialen Kompartiment der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse.....	30
3.1.3. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse	30
3.2. Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich Histologie, Differenzierungsmarkern und Lamininketten am Warthin-Tumor	36
3.2.1. Histopathologische Strukturen des Warthin-Tumors und Darstellung der Basalmembranen mittels Kollagen Typ IV	36
3.2.2. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten in der Basalmembran des Warthin-Tumors	36
3.2.3. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten im lymphoiden Stroma des Warthin-Tumors.....	37
3.3. Das Verteilungsmuster der Lamininketten im pleomorphen Adenom	42
4. Diskussion	48
4.1. Die Lamininisoformen in der menschlichen Speicheldrüse	48

4.1.1. Die neue Definition des Laminin α 1-Antikörpers sowie die Neu-Interpretation der bisherigen Resultate in der menschlichen Speicheldrüse.....	48
4.1.2. Die Laminin α 2-Kette als Marker für myoepitheliale Zellen	50
4.1.3. Die Laminin α 5-Kette ist in den epithelialen Basalmembranen der Speicheldrüse ubiquitär nachweisbar.....	50
4.1.4. Die Lamininketten β 1 und β 2 in der menschlichen Speicheldrüse	52
4.1.5. Die Ketten des Laminin-5 (α 3, β 3 und γ 2) in der menschlichen Speicheldrüse.....	53
4.1.6. Die Lamininkette γ 1 ist Bestandteil aller epithelialen Basalmembranen der humanen Speicheldrüse	54
4.1.7. Das heterogene Auftreten der Lamininisoformen in der menschlichen Speicheldrüse.....	54
4.1.8. Zusammenfassende Betrachtung des Lamininverteilungsmusters in der Speicheldrüse.....	57
4.2. Die Lamininisoformen im Warthin-Tumor der Speicheldrüse.....	58
4.2.1. Das spezifische Lamininmuster des Warthin-Tumors	59
4.2.2. Theorien zur Histogenese des Warthin-Tumors.....	60
4.2.3. Ursprung der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors	62
4.2.4. Vergleich des Expressionsmusters der Lamininisoformen im Warthin-Tumor mit dem der gesunden Speicheldrüse.....	63
4.2.5. Zusammenfassende Definition der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors.....	64
4.3. Die Lamininkettenverteilung im pleomorphen Adenom	65
4.3.1. Die Lamininkettenpolymorphie der basalzelligen und spindelzelligen Komponenten im Pleomorphen Adenom	65
4.3.2. Der formale Gewebsbildungsprozeß des pleomorphen Adenoms in Bezug auf die Lamininkettenverteilung.....	66
4.3.3. Erhalt der Ko-Expression von Laminin und Kollagen Typ IV auch im pleomorphen Adenom	67
4.3.4. Vergleich des Lamininverteilungsmusters im pleomorphen Adenom mit dem der gesunden Speicheldrüse.....	68
4.4. Laminine sind nicht obligat an epitheliale Basalmembranen gebunden.....	69
4.5. Diskontinuierliche Lamininmuster der Basalmembranen sind kein karzinomspezifisches Phänomen	70

4.6. Die diagnostische Wertigkeit von Lamininverteilungsmustern.....	70
4.7. Der Laminin- und Kollagen Typ IV-Gehalt im pleomorphen Adenom als Malignitätsmarker	71
 5. Zusammenfassung	 72
Literaturverzeichnis	74
Lebenslauf	87
Ehrenwörtliche Erklärung	88
Danksagung	89

1. Einleitung

1.1. Definition und Komposition der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist eine wichtige Komponente in der Umgebung aller Zelltypen. Sie besteht aus einer großen Anzahl von Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Diese werden von den umgebenden Zellen produziert und zu einem organisierten Netzwerk zusammengesetzt (Timpl & Aumailley 1989).

Die verschiedenen Zelltypen produzieren eine unterschiedlich zusammengesetzte extrazelluläre Matrix abhängig von dem Grad ihrer Reifung, ihrer Differenzierung und ihrer spezifischen Funktion (Kosmehl et al. 1996).

So differiert die Komposition der Matrix der embryonalen, unreifen Gewebe von der Matrix der adulten Gewebe. Die Matrix unreifer Gewebe muß eine gewisse Flexibilität besitzen und strukturelle Veränderungen zulassen, so daß die für die Differenzierung und Reifung notwendigen Gewebsumbauvorgänge ermöglicht werden. Im Gegensatz dazu wird die adulte Matrix von endgültig differenzierten Zellen produziert und stellt ein spezialisiertes, reifes Proteingeflecht dar. Den reifen Geweben wird eine mehr komplexere extrazelluläre Matrix zugeschrieben (Adams & Watt 1993). Diese adulte Matrix stabilisiert die Gewebe und trennt einzelne Kompartimente voneinander ab. Sie ermöglicht eine strukturelle Stabilität der Gewebe und hat auch die Aufgabe einer physikalischen Barriere oder eines selektiven Filters für lösliche Moleküle.

Die extrazelluläre Matrix greift direkt in die Regulation von Differenzierung, Regeneration und Apoptose der Gewebe ein. Sie beeinflusst diese Prozesse so tiefgreifend, daß die Abwesenheit der Matrix eine vollständige Blockade der weiteren Entwicklung eines Gewebes zur Folge hat. Am Beispiel der Entwicklung der Skelettmuskulatur bedeutet dies, daß bei dem Fehlen der Lamininmoleküle, einem Hauptbestandteil der Basalmembranen, eine Fusion der Skelettmuskelzellen zu einem funktionellen Synzytium nicht stattfindet und dies folglich das Ende dieses Gewebes darstellt (von der Mark & Ocalan 1989).

Es bestehen also komplexe Interaktionen und eine Abhängigkeit zwischen den Zellen und ihrer Umgebung, wobei die Zellen ihre umgebende Matrix synthetisieren und die Matrixkomponenten die Zellproliferation und -differenzierung modulieren (Bissell et al. 1982; Bissell & Ram 1989).

Die extrazelluläre Matrix tritt in unterschiedlicher Weise in Erscheinung – entweder in Form eines fibrillär aufgebauten Netzwerkes, in dem die verschiedenen Zelltypen, zum Beispiel die Chondrozyten, eingebettet sind, oder sie tritt hochorganisiert als Basalmembran auf.

1.2. Die Basalmembran – Komposition, Struktur und Funktion

Die Basalmembran wird als eine spezialisierte Region der extrazellulären Matrix angesehen und stellt eine komplexe extrazelluläre Struktur dar (Bosman et al. 1989). Sie kann mittels einer Versilberung lichtmikroskopisch dargestellt werden, wobei hauptsächlich die retikulären Fasern, also die Sammlung aus sehr feinen Kollagenfibrillen, gezeigt werden oder unter Verwendung einer PAS-Reaktion, mit der man die basalmembranassoziierten Polysaccharide erkennt (Sorokin & Hoyt 1978).

Anhand elektronenmikroskopischer Methoden kann die Basalmembran ebenfalls dargestellt werden. Ihr ultrastruktureller Aufbau kann somit sichtbar gemacht und klar definiert werden. Die Darstellung der Basalmembran wird ergänzt durch den Nachweis basalmembranassoziierten Substanzen an Hand immunhistochemischer Techniken.

1.2.1. Komposition der Basalmembran

Die Basalmembran besteht aus einer fast unüberschaubaren Vielzahl verschiedener Matrixmoleküle, die in komplexer Form organisiert zusammengesetzt sind.

Martinez & Amenta beschrieben die Basalmembransubstanzen in zwei Gruppen. Zum Einen sind dies die intrinsischen Bestandteile wie das Kollagen Typ IV, die Laminine, Heparansulphatproteoglykan und Entactin, welche als Komponenten der Basalmembran gelten, die ausschließlich in dieser auftreten, und zum Anderen die extrinsischen Substanzen, zu denen die Fibronektine und das Kollagen Typ V zählen. Diese sind nicht an die Struktur der Basalmembran gebunden, sondern können auch in ihrer Umgebung vorkommen (Martinez & Amenta 1983).

Die Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagenfibrillen vom Typ IV, welche das Gerüst der Basalmembran bilden, und die Laminine, die die Fibrillen vernetzen und somit als wichtigste nichtkollagenöse Bestandteile einen entscheidenden Beitrag am Aufbau der Basalmembran leisten (Foidart et al. 1980; Timpl et al. 1981; Martin & Timpl 1987).

Im Weiteren sind noch eine Reihe weiterer Glykoproteine und Proteoglykane wie die Tenascine oder die Fibronectine am Aufbau der Basalmembran beteiligt.

Wie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix differiert auch die Komposition der Basalmembran zwischen den verschiedenen Geweben. Sie wird nach dem jeweiligen Reifungsgrad und der Differenzierung des Gewebes modifiziert, so daß eine gewebsspezifische Expression der Matrixmoleküle stattfindet.

Doch nicht nur die verschieden starke Expression der Basalmembransubstanzen trägt zu der unterschiedlichen Zusammensetzung der Basalmembran bei, sondern auch die Existenz und der Einbau differenter Isoformen der konstant exprimierten Glykoproteine hat einen Anteil daran (Hindermann et al. 1999).

Die Entstehungsmechanismen dieser Isoformen der Matrixmoleküle sind vielfältig. Am Beispiel der Laminine, einer heterotrimer aufgebauten Molekülfamilie, führt ein einfacher Kettenaustausch innerhalb des Moleküls zu einer Isoform (Leivo & Engvall 1988). Auch das alternative Spleißen führt am Beispiel des Kollagen Typ VI zu Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (Doliana et al. 1990). Die posttranslationale Modifikation der Matrixmoleküle, beispielsweise in Form einer Glykosylierung, wie sie bei den Lamininen stattfindet, stellt eine weitere Form der Modifikation von Matrixmolekülen dar, die zu weiteren strukturellen Variationen der extrazellulären Matrix führt (Dean et al. 1990).

1.2.2. Struktur der Basalmembran

Nachdem die Struktur der Basalmembran schon lange Zeit mittels Techniken der Versilberung und der PAS-Färbung untersucht wurde, stehen in jüngerer Vergangenheit verbesserte Methoden wie die Elektronenmikroskopie zur Verfügung, die es ermöglichen, einen Einblick in den ultrastrukturellen Aufbau der Basalmembran zu erlangen.

Die Grundstruktur aller untersuchten Basalmembranen entsteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk feiner Fibrillen. Eine Fibrille ist ein durchschnittlich 4 nm dicker Strang, der sich in unregelmäßiger Weise mit anderen Fibrillen bindet. Jede Fibrille ist aufgebaut aus einem Kernfilament, welches von dem Kollagen Typ IV gebildet wird, und einer Umhüllung aus anderen Basalmembrankomponenten, zu denen unter anderem auch die Laminine zählen. Zusammen mit dem Heparansulfatproteoglykan, die circa 4,5 nm dicke Stränge bilden, entsteht das fibrilläre Netzwerk.

Die Basalmembranen werden unterteilt in drei Gruppen: 1. Dünne Basalmembranen, 2. Doppelte Basalmembranen, wie sie die Nierenglomeruli besitzen, und 3. Dicke Basalmembranen, die in der Reichert-Membran im Embryo zu finden sind.

Die dünnen Basalmembranen, weniger als 0,2 µm dick, bestehen aus drei Schichten: einer hellen Lamina lucida (oder Lamina rara), die direkt an die angrenzenden Zellen anschließt, der Lamina densa, die die zentrale Schicht bildet, und der Pars fibroretikularis, an die das angrenzende Gewebe anschließt. Die letztere beinhaltet Komponenten, die auch in der Lamina densa zu finden sind. Sie kann in ihrer Dicke und Zusammensetzung sehr variabel ausgebildet sein sowie vollständig fehlen.

Doppelte Basalmembranen entstehen aus der Verschmelzung zweier Laminae densae, so daß eine Lamina densa erhalten bleibt.

Dicke Basalmembranen werden gebildet aus einer außergewöhnlich dicken Lamina densa, die eine Dicke von bis zu 2 µm erreicht (Inoue 1994).

Heutzutage gilt es jedoch als wahrscheinlich, daß die Lamina lucida ein durch die angewandten Techniken der Kryofixation hervorgerufener Artefakt ist und daß die dünnen und doppelten Basalmembranen nur aus einer Lamina densa bestehen (Chan et al. 1993).

Immunoperoxidasefärbungen zeigten eine positive Reaktion für Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglykan, Entactin und Fibronectin in der Lamina densa, also in der Schicht, die aus dem dreidimensionalen, fibrillären Netzwerk besteht (Laurie et al. 1984).

1.2.3. Funktion der Basalmembran

Die Basalmembran ist beteiligt an Prozessen wie der Zelldifferenzierung und -proliferation, der Migration von Zellen, der Genexpression sowie der Apoptose (Timpl 1996; Nand et al. 1999).

Sie ist die am höchsten organisierte und komplizierteste Form der extrazellulären Matrix und stellt eine äußerst komplexe Struktur dar.

Ihr kommt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Gewebsarchitektur zu. Sie hat die Funktion einer strukturellen Stütze für die Gewebe und kompartimentiert diese untereinander. Basalmembranen trennen Epithelien und Endothelien von ihrem umgebenden Stroma. Im Falle einer Gewebsregeneration stellen sie Leitstrukturen für den Erhalt des architektonischen Gewebsmusters dar.

Die Zell-Basalmembranverbindung wird unter anderem ermöglicht durch eine ultrastrukturelle Organelle, die Hemidesmosomen. Diese bilden gemeinsam mit den aus der Basalmembran ragenden Ankerfilamenten den epithelialen Adhäsionskomplex, dessen entscheidendes Strukturprotein das Laminin-5 ist (Rousselle et al. 1991; Lohi et al. 1998). Über Rezeptoren und Zelloberflächenproteine interagieren die Laminine mit den Zellen. Bekannte Rezeptoren und rezeptorähnliche Moleküle, an die die Laminine binden, sind verschiedene Integrine, das Dystroglykan und das Agrin. Die Integrine bilden sich, ähnlich dem Aufbau der Laminine, aus einer Komposition einer α - und einer β -Kette. Bevorzugt binden die Laminine an verschiedene β 1- und β 4-Integrine. Am Beispiel des Laminin-5 findet eine Bindung zu den Integrinen α 6 β 1, α 6 β 4 und α 3 β 1 statt, wobei die Interaktion zum α 6 β 4-Integrin die Bedeutendste für die Bindung der Zellen auf der Basalmembran und die Stabilität dieses Komplexes ist, da ein Fehlen der Expression dieses Integrins zu einer neonatalen Blasenbildung führt (Marchisio et al. 1993; Rousselle & Aumailley 1994). Im Bereich des epidermalen Adhäsionskomplexes erfolgt eine verstärkte Expression von Laminin-5 und dem α 6 β 4-Integrin.

Obwohl das Laminin-5 keine Fähigkeit zur Polymerisation besitzt, wird es in der Basalmembran gefunden. Es erfolgt eine Bindung zum Kollagen Typ VII, den Ankerfilamenten, so daß der Mechanismus der Bindung des Laminin-5 in der Basalmembran beschrieben werden kann. Es wird angenommen, daß die Bindung der Keratinfilamente der Epithelzellen über die Hemidesmosomen und das Laminin zu den

Ankerfilamenten eine sichere und feste Verbindung zwischen den Epithelzellen und der Basalmembran ermöglicht und diese dem Gewebe die notwendige Stabilität verleiht und eine gewisse Resistenz gegenüber Oberflächenspannungen bietet (Rousselle et al. 1997).

Eine Verminderung dieser Verankerung der Zellen auf der Basalmembran, beispielsweise durch genetische Defekte des Laminin-5, des $\alpha 6 \beta 4$ -Integrins oder des Kollagen Typ VII führt zu einer schweren und letalen blasenbildenden Dermatoze, der Epidermiolysis bullosa (Korge & Krieg 1996).

An einem weiteren Beispiel aus der Lamininfamilie, dem Laminin-1, welches das am stärksten exprimierte Laminin während der frühen Embryogenese darstellt, konnte eine weitere ligandenspezifische Bindung, nämlich zu den Integrinen $\alpha 1 \beta 1$ und $\alpha 2 \beta 1$, nachgewiesen werden (Dziadek & Timpl 1985; Languino et al. 1989; Colognato et al. 1995). Untersuchungen von Stephens und Mitarbeitern zeigten, daß das Fehlen der Expression der $\beta 1$ -Integrine in der Maus schon während der Implantation, also einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung, zum Absterben des Organismus führt (Stephens et al. 1995).

Im Weiteren haben Untersuchungen an der Mamma gezeigt, daß Basalmembranirregularitäten und -abbrüche zur Apoptose des Drüsenepithels führen, was den Untergang dieses Gewebes bedeutet (Bissell & Ram 1989).

An diesen Beispielen wird deutlich, daß der Basalmembran schon während den frühesten Entwicklungsphasen eine komplexe und aktive Rolle in der Regulierung von Morphogenese und Metabolismus des umgebenden Gewebes zukommt und sie nicht nur als passive Barriere und Gewebstütze dient. Es gilt somit als bewiesen, daß die komplexe Struktur der Basalmembran einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gewebsstruktur und zum zellulären Überleben leistet (Colognato & Yurchenco 2000).

1.2.4. Basalmembranen in der Tumordiagnostik

Viele Studien haben bisher gezeigt, daß der Struktur der Basalmembran eine bedeutende Rolle im Verlauf der Tumorprogression zukommt. Ein Verlust von Basalmembrankomponenten durch die Verminderung infolge der Wirkung proteolytischer Enzyme oder ein Fehlen der Biosynthese ist korreliert mit dem Fortschreiten des Tumorwachstums.

Die Darstellung der Basalmembran kann mittels monoklonaler Antikörper gegen die Basalmembransubstanzen erfolgen, wobei in normalen Geweben beispielsweise der Nachweis der $\alpha 1$ -Kette des Kollagen Typ IV eine kontinuierliche Färbung der Basalmembran zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt die gleiche Färbung in Lungentumoren eine unregelmäßige Verteilung des Kollagen Typ IV um Gruppen von Tumorzellen (Polette et al. 1997). In gleicher Weise ist das Kollagen Typ VII in der frühen Entwicklung des malignen Melanoms sowie im Brustkrebs nicht mehr nachzuweisen (Kirkham et al. 1989; Wetzels et al. 1991). Der Nachweis von Kollagen Typ IV und VII in Geweben kann also mit einem nichtinvasiven Verhalten korreliert sein (Catusse et al. 2000).

In anderer Art und Weise zeigen die Synthese und die Ablagerung von Basalmembrankomponenten eine aktive Rolle der Basalmembranmoleküle während der Tumordinvasion an. Immunhistochemische Studien beweisen ein Vorkommen der $\alpha 3$ -Kette des Kollagen Typ IV um gut differenzierte Zellansammlungen in Bronchialkarzinomen, wogegen diese $\alpha 3$ -Kette nicht in normalen Bronchien dargestellt werden kann (Polette et al. 1997).

Die Expression von Laminin-1 in Magenkarzinomen wird als Risikofaktor für die Metastasierung in die Leber angesehen (Tani et al. 1996).

Im oralen Plattenepithelkarzinoms zeigt die Quantität der Basalmembrandefekte eine Korrelation zu dem invasiven und metastasierenden Potential der Tumorzellen (Harada et al. 1994).

Diese Beispiele beweisen, daß Modifikationen der Basalmembrankomposition sowie strukturelle Irregularitäten der Basalmembranen das invasive Verhalten von Tumorzellen beeinflussen können.

1.3. Die Molekülfamilie der Laminine

Das erste Lamininmolekül wurde im Jahre 1979 aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor isoliert (EHS-Laminin) und gilt seitdem als der Prototyp der Lamininfamilie. Es zeigt einen Aufbau aus drei unterschiedlichen Ketten mit einem Molekulargewicht von jeweils 200 bis 400 kDa. Die Ketten wurden bezeichnet mit A (400 kDa), B1 (220 kDa) und B2 (200 kDa) (Timpl et al. 1979; Beck et al. 1990).

Die Laminine bilden einen Hauptbestandteil der Basalmembranen und sind, neben dem Kollagen Typ IV, maßgeblich an deren Aufbau beteiligt.

Die Laminine sind kreuzförmig aufgebaut und besitzen, mit Ausnahme der Laminine, an deren Aufbau eine $\alpha 3$ -Kette beteiligt ist, einen selbstbindenden Charakter, der sie befähigt, untereinander eine netzartige Struktur auszubilden. Dieses Geflecht tritt nun in Kontakt mit dem Rückgrat der Basalmembranen, den Kollagenfibrillen, die ebenfalls vernetzt auftreten, und in Verbindung mit anderen Proteoglykanen und Glykoproteinen die hochorganisierte Struktur der Basalmembran bilden.

Untersuchungen mit Hilfe der cDNA-Sequenzierung gaben Anlaß zur Annahme der Existenz von Isoformen der Lamininketten, die sich von denen im EHS-Laminin unterscheiden (Hunter et al. 1989).

Bekannte Proteine wie das Merosin und neu entdeckte Proteine wurden darauffolgend als Varianten des Laminins angesehen, was zu der Hypothese führte, daß die Laminine eine Molekülfamilie darstellen (Tryggvason 1993).

In diesen neuen Lamininen ist die trimere Struktur, wie sie im EHS-Laminin beschrieben wurde, erhalten.

In einer Neuklassifikation der Laminine von Burgeson und Mitarbeitern wurde die Einteilung der Lamininketten in α , β und γ vorgeschlagen, die sich an der Klassifikation anderer Moleküliisoformen der extrazellulären Matrix anlehnte. Aufgrund dieser neuen Nomenklatur wurde das EHS-Laminin in Laminin-1 umbenannt und die isolierten Ketten A, B1 und B2 als $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette bezeichnet (Burgeson et al. 1994).

Infolge weiterer Erforschung der Lamininmoleküle wurden weitere homologe Ketten isoliert, so daß gegenwärtig fünf α -Ketten, drei β -Ketten und drei γ -Ketten beschrieben werden. Aufgrund des Bestehens dieser Ketten ($\alpha 1$ -5, $\beta 1$ -3 und $\gamma 1$ -3) wurden bis heute

zwölf Isoformen des Laminins isoliert, die sich in ihrer Kettenzusammensetzung durch den Austausch einzelner homologer Ketten unterscheiden.

Obwohl durch die vorhandenen fünf langen α -Ketten und die jeweils drei kürzeren β - und γ -Ketten theoretisch eine Zusammensetzung von insgesamt 45 Lamininisoformen möglich wäre, ist die Anzahl der bekannten Lamininisoformen bislang auf zwölf beschränkt. Dies begründet sich darin, daß sich nicht jede Kette mit jeder anderen Kette binden kann. So ist zum Beispiel noch keine Isoform bekannt, die gleichzeitig die γ_2 -Kette und die β_1 -Kette beinhaltet.

Diese zwölf bekannten Lamininisoformen erwachsen aus einer unterschiedlichen Komposition aus jeweils einer α -, einer β - und einer γ -Kette, die sich in heterotrimerer Form zum jeweiligen Lamininmolekül zusammensetzen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die Kettenkomposition der Lamininisoformen

Lamininisoform	Frühere Bezeichnung	Kettenkomposition	Referenz
Laminin-1	EHS-Laminin	$\alpha_1\beta_1\gamma_1$	Beck et al. 1990
Laminin-2	Merosin	$\alpha_2\beta_1\gamma_1$	Engvall et al. 1990
Laminin-3	s-Laminin	$\alpha_1\beta_2\gamma_1$	Engvall et al. 1990
Laminin-4	s-Merosin	$\alpha_2\beta_2\gamma_1$	Engvall et al. 1990
Laminin-5	Kalinin/Nicein	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	Rousselle et al. 1991
Laminin-6	k-Laminin	$\alpha_3\beta_1\gamma_1$	Marinkovich et al. 1992
Laminin-7	ks-Laminin	$\alpha_3\beta_2\gamma_1$	Champlaud et al. 1996
Laminin-8		$\alpha_4\beta_1\gamma_1$	Miner et al. 1997
Laminin-9		$\alpha_4\beta_2\gamma_1$	Miner et al. 1997
Laminin-10		$\alpha_5\beta_1\gamma_1$	Miner et al. 1997
Laminin-11		$\alpha_5\beta_2\gamma_1$	Miner et al. 1997
Laminin-12		$\alpha_2\beta_1\gamma_3$	Koch et al. 1999

1.3.1. Die Lamininisoformen – Nachweisverfahren, Aspekte der Gewebsverteilung und Struktur

Die verschiedenen Lamininisoformen können mittels kettenspezifischer monoklonaler Antikörper oder durch mRNA in situ Hybridisierung identifiziert werden (Sorokin et al. 1992; Matsui et al. 1995).

Immunhistochemische Studien unter Verwendung von Antikörpern gegen Komponenten der extrazellulären Matrix in der quergestreiften Skelettmuskulatur zeigten eine unterschiedliche Färbung der Basalmembranstruktur der Synapse und der Basalmembran außerhalb der Synapse (Sanes & Hall 1979). Später wurde dieses synaptische Laminin, das s-Laminin (Laminin-3), beschrieben, dessen s-Kette ($\beta 2$) homolog zur $\beta 1(B1)$ -Kette des Laminin-1 ist (Hunter et al. 1989; Martin et al. 1995).

Aus der Basalmembran der Skelettmuskelzellen und der Basalmembran von Kardiomyozyten wurde eine weitere Lamininisoform isoliert, das Merosin. Diese neue Lamininvariante enthält die M-Kette ($\alpha 2$), welche zur $\alpha 1(A)$ -Kette als homolog beschrieben wird, und entspricht nach der neuen Nomenklatur dem Laminin-2 (Ehrig et al. 1990).

Eine weitere Lamininisoform, das s-Merosin (Laminin-4), besitzt eine Kettenkomposition aus der $\alpha 2(M)$ -Kette entsprechend dem Laminin-2 (Merosin), der $\beta 2(s)$ -Kette, wie sie im Laminin-3 (s-Laminin) beschrieben wird und der $\gamma 1(B2)$ -Kette aus dem Laminin-1 (Engvall et al. 1990).

Rousselle und Mitarbeiter konnten ein epitheliales membranspezifisches Adhäsionsmolekül beschreiben, welches sie Kalinin nannten (Rousselle et al. 1991). Dieses neue Molekül entspricht dem Adhäsionsmolekül Nicein (Marinkovich et al. 1993). Es gehört ebenfalls zur Lamininfamilie und besteht aus einer neuen, langen $\alpha 3$ -Kette, einer neuen $\beta 3$ -Kette (Pulkkinen et al. 1994) und einer neuen $\gamma 2$ -Kette, die im Gegensatz zu ihrer homologen $\gamma 1$ -Kette verkürzt ist (Kallunki et al. 1992). Ein anderes Molekül der epithelialen Basalmembran ist das Epiligrin, welches in engem Kontakt zum Kalinin/Nicein auftritt (Carter et al. 1991). In der neuen Nomenklatur werden diese drei Moleküle einheitlich als Laminin-5 bezeichnet (Timpl & Brown 1994).

Marinkovich und Mitarbeiter beschrieben ein weiteres Mitglied der Lamininfamilie, das k-Laminin (Laminin-6), welches die aus dem Laminin-1 bekannte $\beta 1$ -Kette, die $\gamma 1$ -Kette sowie eine lange $\alpha 3$ -Kette enthalten. Dieses k-Laminin ist ebenfalls wie das Kalinin (Laminin-5) Bestandteil der Ankerfilamente (Marinkovich et al. 1992).

Das ks-Laminin, eine weitere Isoform aus der Lamininfamilie, entsteht aus einer Verbindung aus der $\alpha 3$ -Kette, analog dem Laminin-5 und -6, sowie der $\beta 2(s)$ -Kette und der $\gamma 1(B2)$ -Kette. Dieses Lamininmolekül wird nach der neuen Nomenklatur als Laminin-7 bezeichnet (Champlaud et al. 1996).

Die Laminine-5, -6 und -7 unterscheiden sich von den anderen Lamininmolekülen in der Hinsicht, daß sie nicht die Fähigkeit zur Polymerisation besitzen. Sie können somit untereinander kein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Diese Fähigkeit zur Bindung der Lamininmoleküle untereinander geht verloren, sobald diese eine $\alpha 3$ -Kette besitzen (Laminine-5, -6, und -7), denn diese ist im Gegensatz zur $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette verkürzt. Es sind somit nur zwei bindungsfähige kurze Arme vorhanden (Cheng et al. 1997).

Nachdem die ersten Mitglieder der Lamininfamilie seit dem Jahr 1979 bis zur Mitte der 90er Jahre mit Methoden der Biochemie und Immunhistochemie identifiziert wurden, kann man nun in jüngerer Vergangenheit feststellen, daß sich die Nachweismethoden zu Gunsten molekularbiologischer Methoden ändern.

Mit Hilfe dieser neuen Methoden konnten nun erstmals die Gene zweier neuer α -Ketten identifiziert werden, noch bevor die eigentlichen Genprodukte dieser Gene nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich hierbei um die $\alpha 4$ -Kette und die $\alpha 5$ -Kette (Iivanainen et al. 1995a; Miner et al. 1995). Unter Verwendung der Sequenzanalyse konnte angenommen werden, daß die $\alpha 4$ - und die $\alpha 5$ -cDNA ein lamininähnliches Molekül kodieren. Miner und Mitarbeiter benutzten nun die $\alpha 4$ - und die $\alpha 5$ -cDNA, um rekombinante Proteine herzustellen und Antiseren zu produzieren. Die Resultate dieser Studie bewiesen die Existenz von vier neuen heterotrimeren Lamininmolekülen: Laminin-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), Laminin-9 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$), Laminin-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) und Laminin-11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) (Miner et al. 1997).

Mittels der gleichen Methoden konnten Koch und Mitarbeiter die derzeit neueste Lamininisoform nachweisen, das Laminin-12. Diese besteht aus den bekannten $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Ketten sowie aus einer neuen $\gamma 3$ -Kette. Diese besitzt die gleiche Domänenstruktur wie die beiden bekannten γ -Ketten, ist jedoch zusätzlich zweifach glykosyliert und besitzt eine Nidogen-Bindungsstelle (Koch et al. 1999).

Da es sich bei den Lamininen um eine wachsende Molekülfamilie handelt, ist nicht auszuschließen, daß sich das Spektrum der Lamininketten stetig erweitert, so daß neben den genannten zwölf Lamininisoformen weitere Mitglieder der Lamininfamilie beschrieben werden können.

1.3.2. Die Domänenstruktur der Laminine

Am Beispiel des Laminin-1 wurde mittels Elektronenmikroskopie und proteolytischer Fragmentierung gezeigt, daß das Laminin-1 eine Struktur besitzt, die aus dem Aufbau aus verschiedenen Domänen resultiert (Beck et al. 1990; Engel 1993). Dank der kompletten Sequenzanalyse der drei Ketten konnte nun gezeigt werden, daß das Laminin-1-Molekül aufgrund der Domänenstruktur aus einem langen Arm und drei ähnlich aufgebauten kurzen Armen besteht (Sasaki et al. 1988). Der lange Arm wird von Teilen aller drei Ketten gebildet, die in diesem Teil des Moleküls zu einer dreisträngigen, spiralartigen Struktur gebunden sind und somit die Domänen I und II bilden, an deren Ende sich das Carboxylende in Form der G-Domäne befindet. Die Domänen IIIa bis VI bilden die drei kurzen Arme, an deren Aufbau die N-terminalen Regionen der Ketten $\alpha 1$, $\beta 1$ und $\gamma 1$ beteiligt sind. Diese Domänen werden aus einer verschiedenen Anzahl EGF-artiger Wiederholungen (IIIa, IIIb und V) gebildet, zwischen denen kugelförmige Regionen in Form der Domänen IVa, IVb und VI eingebaut sind (Engel 1993; Engvall & Wewer 1996). Der Aufbau der anderen Lamininisoformen entspricht ebenfalls dieser Domänenstruktur wie sie am Laminin-1 zu sehen ist. Diese Struktur stellt somit ein universelles Bauprinzip in der Zusammensetzung der Laminine dar. Jedoch unterscheiden sich die Ketten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ insofern, daß, im Gegensatz zu ihren homologen Ketten im Laminin-1-Molekül, eine Reihe von Deletionen in ihren kurzen Armen auftreten, die somit auch zu unterschiedlichen Molekülmassen der homologen Ketten führen. Diese Deletionen beruhen auf einem geringeren Gehalt an EGF-artigen Wiederholungen in den einzelnen Domänen oder einer fehlenden Expression von Domänen (Galliano et al. 1995; Richards et al. 1996). Es gibt jedoch auch Ketten, wie zum Beispiel die $\alpha 5$ -Kette, die eine erhöhte Anzahl EGF-artigen Wiederholungen besitzen und somit länger sind als ihre homologen Ketten (Miner et al. 1995).

1.3.3. Gewebliche Verteilung der Lamininisoformen – Perspektiven für die Tumordiagnostik

Die Expression der verschiedenen Lamininisoformen ist abhängig vom Gewebetyp und dem Reifungsgrad des Gewebes, so daß sich eine differenzierungs- und reifungsabhängige Heterogenität der Basalmembranen ausbildet (Engvall et al. 1990).

Einen detaillierten Überblick über die prinzipielle Gewebsverteilung der einzelnen Lamininketten gibt die folgende Tabelle 2:

Tabelle 2. Die gewebetypischen Expressionsmuster der Lamininketten (Colognato & Yurchenco 2000)

Lamininkette	Expression in folgendem Gewebe
$\alpha 1$	in früher Embryonalentwicklung (Blastozyste); in fetaler Niere, Retina und Gehirn
$\alpha 2$	Skelett- und Herzmuskel, periphere Nerven, Kapillaren, Gehirn
$\alpha 3$	Haut und andere Epithelien
$\alpha 4$	vor allem mesenchymale Zellen (Muskel, Lunge, Nerv)
$\alpha 5$	diverse Epithelien, Niere, Synapsen
$\beta 1$	in den meisten Geweben
$\beta 2$	neuromuskuläre Verbindung, Glomeruli
$\beta 3$	Haut und andere Epithelien
$\gamma 1$	in den meisten Geweben
$\gamma 2$	Haut und andere Epithelien
$\gamma 3$	Haut; nicht basalmembranassoziiert, sondern an der apikalen Oberfläche von Epithelzellen in Lunge und Reproduktionstrakt

Es zeigt sich, daß die $\alpha 1$ -Kette wohl die am stärksten exprimierte Lamininkette während der Embryonalentwicklung darstellt und sie in Verbindung mit der $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette (Laminin-1) als essentielle Lamininisoform in den frühen Entwicklungsphasen auftritt (Dziadek & Timpl 1985). Im Weiteren läßt sich eine Relation zwischen der $\alpha 2$ -Kette mit der quergestreiften Skelettmuskulatur und den peripheren Nerven erkennen, während die $\beta 2$ -Kette vorwiegend in Nerven zu finden ist (Engvall et al. 1990; Martin et al. 1995). Die Ketten $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ bilden als Ankerfilamente charakteristische Bestandteile epithelialer Basalmembranen und treten dort gemeinsam als Laminin-5 auf (Rousselle et al. 1991).

Die dargestellte Heterogenität der Basalmembranen bezüglich der Lamininkettenexpression ist nicht nur in den verschiedenen Geweben zu finden, sondern läßt sich ebenfalls innerhalb spezieller Gewebe zeigen. Virtanen und Mitarbeiter beweisen diese differentielle Expression der Lamininketten in der menschlichen Magenschleimhaut. Sie zeigen ein ubiquitäres Vorkommen der $\alpha 1$ -Kette in allem Magenabschnitten, sowohl im oberflächlichen Epithel, als auch in den Krypten und im Drüsenepithel. Die Lamininkette $\alpha 2$ ist verstärkt in den Drüsen sowie in den unteren Teilen der Krypten lokalisiert, wogegen die $\alpha 3$ -Kette hauptsächlich unter dem Oberflächenepithel und in den oberen Teilen der Krypten zu finden ist. In der Basalmembran der Krypten kann eine Überlappung der Expression der $\alpha 2$ - und der $\alpha 3$ -Kette festgestellt werden, in deren Bereich auch eine verstärkte Ansammlung proliferierender Epithelzellen zu sehen ist. Die Ketten $\beta 1$ und $\gamma 1$ sind ebenfalls in allen Basalmembranen nachzuweisen, während die Expression der $\beta 2$ -Kette nur auf einige Drüsen beschränkt ist. Die somit nachgewiesene Heterogenität der Schleimhaut bezüglich der Lamininkettenverteilung bedingt auch eine unterschiedliche Lokalisation der Lamininisoformen. Die Drüsen sowie die tiefen Teile der Krypten enthalten vorwiegend die Laminine-1, -2 und -5 und im Oberflächenepithel werden verstärkt die Laminine-1, -5 und -6 exprimiert. Diese unterschiedliche Basalmembranzusammensetzung bedingt nun eine unterschiedliche Differenzierung der Epithelzellen, entweder in Oberflächenepithel, das Epithel der Krypten oder in Drüsenepithel, wonach man auch auf verschiedene Funktionen der einzelnen Abschnitte schließen kann, so daß beispielsweise das Oberflächenepithel eine Fähigkeit zur raschen Regeneration besitzt, da es stärkerem Streß ausgesetzt ist (Virtanen et al. 1995b).

Die Lamininkettenverteilung, die somit abhängig von der Differenzierung und der spezifischen Funktion der einzelnen Zellen ist, ist nicht nur im normalen Gewebe zu finden, sondern wird auch in den korrespondierenden Tumoren beibehalten. Zum Beispiel ist das Laminin-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) ein charakteristischer Bestandteil von Schwannzellen der peripheren Nerven und ist ebenso in Schwannzelltumoren zu finden (Leivo et al. 1989).

Laminin-5 ist als Teil epithelialer Basalmembranen zu finden und tritt ebenfalls in einem korrespondierenden Tumor, dem Plattenepithelkarzinom, auf (Pyke et al. 1994).

Die Verringerung der zellulären Differenzierung in malignen Tumoren kann von einer Reexpression embryonaler Eigenschaften begleitet werden. Im Gegensatz zu adulten Geweben findet man in embryonalen Basalmembranen eine weite Verbreitung der $\beta 2$ -

Kette, die hier wohl die β 1-Kette funktionell vertritt (Iivanainen et al. 1995b). Eine Reexpression der β 2-Kette kann in benignen und malignen Läsionen der Mamma, in hyperplastischem Plattenepithel und in der nodulären Palmarfibromatose dargestellt werden (Henning et al. 1995; Kosmehl et al. 1995). Karzinomzellen synthetisieren die β 2-Kette in Kultur unabhängig von ihrer Differenzierung, was als ein Wiederauftreten embryonaler Eigenschaften gewertet werden kann (Wewer et al. 1994b).

1.4. Klassifikation epithelialer Tumoren menschlicher Speicheldrüsen

Nachdem in der ersten Ausgabe der WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren die Einteilung der Tumoren sich nach dem Grundprinzip richtete, ob die Tumoren eine monomorphe oder pleomorphe Zusammensetzung besitzen, werden die Speicheldrüsentumoren nach heutigem Wissensstand differenzierter eingeteilt. Die histopathologische Klassifikation beruht nun auf dem Prinzip, daß die Tumoren nach den Zelltypen beschrieben und benannt werden, die in den Tumoren vorkommen.

Die zelluläre Differenzierung innerhalb der Speicheldrüsentumoren ist sehr vielgestaltig, so daß hier, analog dem Aufbau der Speicheldrüsen, azinäre, duktale und modifizierte Myoepithelzellen gezeigt werden können.

Die Mehrheit der Speicheldrüsentumoren zeigt ein Vorkommen verschiedener zellulärer Differenzierungen. Tumoren, die nur aus einem Zelltyp aufgebaut sind, bilden die Minderheit.

Der am häufigsten in den verschiedenen Speicheldrüsentumoren auftretende Zelltyp wird von den Myoepithelzellen gebildet, die in einer großen morphologischen Variationsbreite auftreten.

Im Folgenden soll die Klassifikation der epithelialen Tumoren der menschlichen Speicheldrüsen in Übereinstimmung mit der 2. Auflage der WHO-Klassifikation von 1991 gezeigt werden (Seifert 1991). Die Adenome und Karzinome der Speicheldrüsen bilden als epitheliale Tumoren mit insgesamt 85% den bedeutendsten Anteil an den Speicheldrüsentumoren (Speicheldrüsen-Register Hamburg 1965-1994).

Tabelle 3. Klassifikation epithelialer Tumoren der menschlichen Speicheldrüsen
(Seifert 1991)

1. Adenome	2. Karzinome
1.1. Pleomorphes Adenom	2.1. Azinuszellkarzinom
1.2. Myoepitheliom	2.2. Mukoepidermoidkarzinom
1.3. Basalzelladenom	2.3. Adenoid-zystisches Karzinom
1.4. Warthin-Tumor	2.4. Polymorphes low-grade Adenokarzinom
1.5. Onkozytom	2.5. Epithelial-myoepitheliales Karzinom
1.6. Kanalikuläres Adenom	2.6. Basalzell-Adenokarzinom
1.7. Talgdrüsenadenom	2.7. Talgdrüsenkarzinom
1.8. Duktales Papillom	2.8. Papilläres Zystadenokarzinom
- Invertes duktales Papillom	2.9. Muzinöses Adenokarzinom
- Intraduktales Papillom	2.10. Onkozytäres Karzinom
- Sialadenoma papilliferum	2.11. Speichelgangkarzinom
1.9. Zystadenom	2.12. Adenokarzinom
- Papilläres Zystadenom	2.13. Malignes Myoepitheliom
- Muzinöses Zystadenom	2.14. Karzinom im pleomorphen Adenom
	2.15. Plattenepithelkarzinom
	2.16. Kleinzelliges Karzinom
	2.17. Undifferenziertes Karzinom
	2.18. Andere Karzinome

1.5. Problemstellung

Die Laminine stellen eine wachsende Molekülfamilie dar. Die Lamininisoformen werden differenzierungs- und reifeabhängig exprimiert.

- I. Ziel der Studie ist die Überprüfung der Hypothese, daß differenten Strukturen der duktuloazinären Einheit der Speicheldrüsen differente Lamininisoformen zugeordnet werden können.

Im Ergebnis erfolgt eine dem derzeitigen Kenntnisstand der Lamininketten entsprechende Beschreibung der mikroanatomischen Verteilung der möglichen Lamininisoformen in der normalen, adulten, humanen Kopfspeicheldrüse.

- II. Die epithelialen Tumoren der Speicheldrüse ahmen die zellulären Differenzierungen der normalen Speicheldrüse nach. Folglich kann das Postulat überprüft werden, daß epitheliale Differenzierungsmuster im Warthin-Tumor und im pleomorphen Adenom anhand ihres Lamininkettenmusters identifiziert werden können.

- III. Laminine sind quantitativ bedeutende Proteine der Basalmembranen. Basalmembranen trennen das Gewebe in Kompartimente und steuern Differenzierungen. Es soll überprüft werden, inwieweit sich im pleomorphen Adenom durch die Lamininmuster Kompartimente und spezialisierte Differenzierungen benennen lassen.

2. Material und Methoden

2.1. Gewebsmaterial

Die 10 untersuchten Proben der großen, menschlichen Speicheldrüsen stammen aus der Glandula parotis beziehungsweise der Glandula submandibularis. Diese wurden aus Gewebe bezogen, das bei Tumoroperationen entfernt wurde. Die Speicheldrüsen zeigten keine Manifestation eines Tumors innerhalb der Drüse. Alle untersuchten Gewebeproben waren offensichtlich normal.

Das Tumormaterial stammt aus operativ entfernten Tumoren, wobei 7 Warthin-Tumoren sowie 10 pleomorphe Adenome untersucht wurden.

2.2. Kryokonservierung für immunhistochemische Verfahren

Die Speicheldrüsenpräparate und das kryokonservierte Tumormaterial wurden unmittelbar nach der Operation in 4°C kalte sterile HANKS' Salzlösung (HBSS, ohne Kalzium und ohne Magnesium; Gibco, BRL) überführt. Das gesamte Material wurde unter sterilen Bedingungen präpariert. 5x5x5 mm große Proben dieser Präparate wurden in Stickstoffgeköhltem flüssigen Propan schockgefroren und bei -70°C steril gelagert (Tiefkühltruhe UF 85-460T, Colora Messtechnik GmbH, Deutschland). Zur Vermeidung einer gefrierbedingten Schrumpfung des Gewebes erfolgte eine Vorbehandlung der Proben in TISSUE-TEK (Miles Inc., Diagnostics Division, Elkhart, USA).

2.3. Paraffineinbettung / konventionelle Histologie

Tumorgewebe wurde unmittelbar nach der Operation in 5% PBS-gepuffertem Paraformaldehyd für 4h fixiert und in Paraplast Plus (Sherwood) im Einbettautomat Hypercentre von Shandon eingebettet. Zur histologischen Bewertung dieser Präparate wurde eine Hämalun-Eosin (H&E) - Färbung zur Kern/Plasma - Differenzierung durchgeführt. Von den eingebetteten Proben wurden 5-10µm dicke Paraffinschnitte

angefertigt (Rotationsmikrotom RM2045, Leica, Deutschland), 6h bei 60°C getrocknet und wie folgt entparaffiniert: Xylol 3x15min, Aceton 4x2min, Aceton/H₂O (2:3) 2min, H₂O/Aceton (2:3), spülen in H₂O. Anschließend erfolgte die Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer (siehe 2.5.1.) für 20min, gefolgt von Spülen in Aqua dest. und 10min Bläuen in fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte in alkoholischer Eosin-Y-Lösung (ACCUSTAIN®) für 3min gefärbt. Die Präparate wurden 2x1-5min in 70%igem Ethanol gespült, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und in neutralem Kanadabalsam eingedeckt.

2.4. Immunhistochemische Technik - APAAP-Methode

Von den unter 2.2. eingefrorenen Proben wurden 5-7µm dicke Kryostatschnitte angefertigt (Cryocut 1800, Leica, Deutschland), auf speziell vorbehandelte Objektträger aufgebracht (POLYSINE™-Mikroslides, Menzel, Deutschland), diese 2h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10min in Aceton fixiert. Die Kryostatschnitte konnten nach Abtrocknen des Acetons entweder in Alu-Folie verpackt bei -70°C gelagert oder unmittelbar für die Immunhistochemie eingesetzt werden.

Die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) zum immunhistochemischen Nachweis spezifisch im Gewebe (histologischer Schnitt) gebundener primärer Antikörper wurde modifiziert nach einem Protokoll von Gustmann und Mitarbeitern durchgeführt (Gustmann et al. 1991). Nach Inkubation der Schnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung der Antikörper in Verdünnungslösung für Primärantikörper, siehe 2.5.6.2., die Antikörperverdünnungen sind in der Tabelle 4 aufgeführt) über Nacht bei 4°C erfolgte eine Behandlung mit einem Kaninchen-anti-Maus-Serum (Dako, Dänemark, Verd.: 1:70 in Verdünnungspuffer für Brückenantikörper, siehe 2.5.6.3.) für 45min bei Raumtemperatur (RT). Im Falle polyklonaler Antiseren wurde als erster Schritt eine Behandlung mit Maus-anti-Kaninchen-Serum (Dako, Dänemark, Verd.: 1:400) eingeschoben. Es folgte dann eine Inkubation mit APAAP-Komplex (Dako, Dänemark, Verd.: 1:70 in Verdünnungspuffer für APAAP-Komplex, siehe 2.5.6.4.) für 45min bei RT. Die Schritte Kaninchen-anti-Maus-Serum und APAAP-Komplex wurden zur Steigerung der Sensitivität der Methode zweimal wiederholt. Zwischen allen Inkubationen wurden die Schnitte gründlich in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS,

siehe 2.5.3.) gespült. Der Nachweis gebundener alkalischer Phosphatase erfolgte mittels Naphtol-AS-BI-Phosphat/Neufuchsin (Entwicklungslösung siehe 2.5.6.5.) unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Zur Blockierung der endogenen Enzymaktivität wurde der Entwicklerlösung 0,25mmol Levamisol (Sigma, USA) zugesetzt. Anschließend wurden die Schnitte gründlich in Leitungswasser gespült und in Glycerol / Gelatine eingedeckt.

2.5. Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierlösungen

2.5.1. *Hämalaun nach Meyer*

- 2,5g Hämatoxylin
- 0,5g Natriumjodat
- 125g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat
- 125g Chloralhydrat
- 2,5g Zitronensäure
- auf 2500ml Aqua dest. , 14 Tage reifen lassen

2.5.2. *PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)*

- 8g NaCl
- 0,2g KCl
- 1,15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,2g KH_2PO_4
- auf 1000ml Aqua dest.

2.5.3. *TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung)*

- 2,25g Tris/Base
- 17,125g Tris/HCl
- 21,95g NaCl

-
- auf 2500ml, pH 7,4-7,6

2.5.4. 4% (5%, 10%) PBS-gepufferte Paraformaldehydlösung

- 4% (5%, 10%) (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei 60°C lösen

2.5.5. 4% PBS-gepufferte Paraformaldehydlösung (RNase-frei)

- 4% (w/v) Paraformaldehyd in DEPC-behandeltem PBS bei 60°C lösen

2.5.6. Puffer für das APAAP-System

2.5.6.1. Tris-Puffer (1)

- 0,45g Tris/Base
- 3,425g Tris/HCl
- 0,5g Natriumazid
- auf 500ml Aqua dest.

2.5.6.2. Verdünnungslösung für Primärantikörper

- 10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer (1)
- 1% (w/v) Rinderserumalbumin (Trockensubstanz)
- pH 7,4

2.5.6.3. Verdünnungslösung für Brückenantikörper

- 10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer (1)

-
- 10% (v/v) inaktiviertes Humanserum

2.5.6.4. Verdünnungslösung für APAAP-Komplex

- 10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer (1)

2.5.6.5. Entwicklungslösung (100ml Ansatz)

- 70ml Entwicklungspuffer (a)
- 25ml Propandiollösung (b)
- 40mg Levamisol
- 500µl Na-Nitritlösung (d)
- 135µl Neufuchsinlösung (c)
- 600µl Naphtol-AS-BI-Phosphatlösung (e)
- auf 100ml Aqua dest.

a) Entwicklungspuffer

- 34,8g NaCl
- 6,0g Tris/HCl
- 19,6g Tris/Base
- auf 700ml Aqua dest.

b) Propandiollösung

- 21g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol auf 1l Aqua dest.

c) Neufuchsinlösung

- 5g Neufuchsin auf 100ml 2N HCl

d) Na-Nitritlösung

- 30mg Na-Nitrit auf 1ml Aqua dest.

e) Naphtol-AS-BI-Phosphat

- 350mg Naphtol-AS-BI-Phosphat auf 6ml DMF

Tabelle 4. Verwendete monoklonale Antikörper gegen Differenzierungsmarker und Matrixproteine

Antigen	Klon	Verdünnung	Quelle	Referenz
ASMA (α -smooth-muscle-actin)	1 A 4	1 : 80	Dako, Dänemark	Skalli et al. 1986
Caldesmon	TD 107	1 : 100	Novocastra	Lin et al. 1988
Kollagen Typ IV	CIV 22	1 : 50	Dako, Dänemark	Odermatt et al. 1984
Lamininkette α 1	EB 7	1 : 20	Prof. Ismo Virtanen Universität Helsinki	Virtanen et al. 2000
Lamininkette α 2	Mer 3/22B2	1 : 5000	Novocastra	Leivo & Engvall 1988
Lamininkette α 3	BM 165	1 : 500	Dr. Patricia Rousselle	Rousselle et al. 1991
Lamininkette α 5	4 C 7	1 : 10000	Telios, USA	Engvall et al. 1990
Lamininkette β 1	4 E 10	1 : 20000	Telios, USA	Wewer et al. 1983 Wewer et al. 1994c Engvall et al. 1986
Lamininkette β 2	C 4	1 : 3000	DSHB, Baltimore, USA	Sanes & Chiu 1983
Lamininkette β 3	6 F 12	1 : 20	Dr. Patricia Rousselle	Marinkovich et al. 1992
Lamininkette γ 1	2 E 8	1 : 500	Telios, USA	Wewer et al. 1983 Engvall et al. 1986
Lamininkette γ 2	GB 3	1 : 20	Harlan Sera-lab, England	Matsui et al. 1995

2.6. Qualitative und semiquantitative Bewertungskriterien der Immunreaktionen für Basalmembranproteine und Differenzierungsmarker in gesunden Speicheldrüsen und Warthin-Tumoren

Die Bewertung der mittels der APAAP-Methode dargestellten extrazellulären Matrixmoleküle in den Basalmembranen der menschlichen Speicheldrüsen beziehungsweise des Warthin-Tumors erfolgte semiquantitativ nach folgendem Bewertungsmaßstab:

Score	Färbeintensität und Merkmal
-	keine immunhistochemische Färbung
+	schwache immunhistochemische Färbung, punktförmig gefärbte Abschnitte der BM
++	mäßige immunhistochemische Färbung, konfluierend gefärbte Abschnitte der BM
+++	starke immunhistochemische Färbung, vollständig gefärbte BM

2.7. Qualitative Bewertungskriterien der Immunreaktionen für Basalmembranproteine und Differenzierungsmarker im pleomorphen Adenom

Die Bewertung der mittels der APAAP-Methode dargestellten extrazellulären Matrixmoleküle im pleomorphen Adenom erfolgte nach folgendem Bewertungsmaßstab, wobei Mehrfachnennungen möglich sind:

Score	Merkmal
1	durchgängige Basalmembranen
2	Basalmembransegmente
3	Spotförmige Deposition
4	Intrazelluläre Deposition

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich Histologie, Differenzierungs- markern und Lamininketten in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse

3.1.1. Histologische Strukturen in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse

In der menschlichen Speicheldrüse kann eine funktionelle Gliederung in die Drüsenazini, das Speichelgangsystem und das Drüseninterstitium dargestellt werden. Die Speicheldrüsen können je nach dem Aufbau und der Funktion ihrer Azini in seröse (Glandula parotis), muköse (Gaumendrüsen) oder gemischte Drüsen (Glandula submandibularis) unterteilt werden.

Im Speicheldrüsenangssystem erfolgt eine weitere Aufgliederung in die Schaltstücke, die sich direkt an die Drüsenazini anschließen. Im weiteren Verlauf schließen sich an die Schaltstücke die Streifenstücke an, die dann in die großlumigen Ausführungsgänge münden.

Die Drüsenazini und das Gangsystem der Speicheldrüsen bilden zusammen ein funktionelles System, die duktoazinäre Einheit.

In den zur Beurteilung vorliegenden Kryostatschnitten konnte regelmäßig diese funktionelle Aufgliederung der Speicheldrüse dargestellt werden, so daß diese eine regelhafte Beurteilung der Speicheldrüsen zulassen. Folglich ist das untersuchte Material repräsentativ und für die weiteren Untersuchungen geeignet. Im Weiteren waren die untersuchten Speicheldrüsen frei von Entzündungen und degenerativen Veränderungen.

Die Basalmembranen der genannten Strukturen werden mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das Kollagen Typ IV dargestellt, um die Basalmembranregion für nachfolgende semiquantitative Bewertungen der Lamininketten beurteilen zu können. Alle Anteile der duktoazinären Einheit weisen eine gleichmäßige, starke Reaktion gegenüber

dem Kollagen Typ IV auf, wobei sich die Basalmembranen durchgängig und ohne Unterbrechungen darstellen.

3.1.2. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Moleküle ASMA und Caldesmon im epithelialen Kompartiment der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse

Mit den immunhistochemischen Färbungen der Moleküle ASMA (α -smooth-muscle-actin) beziehungsweise Caldesmon erfolgt die Darstellung von Zellen mit myoepithelialer Differenzierung, so daß Beziehungen zwischen kontraktile Fähigkeiten und einzelnen Abschnitten der Speicheldrüsen gezeigt werden können.

Mittels der Färbung des muskelspezifischen Aktin (ASMA) kann eine strenge Assoziation des Aktin zu den Drüsenazini gezeigt werden. Die anderen Strukturen, also die Schaltstücke, die Streifenstücke und die Ausführungsgänge, erfahren gegenüber dieser Färbung nur eine schwache Reaktion.

Die Bewertung des Caldesmon, einem Muskelprotein, welches spezifisch in glatten Muskelzellen vorkommt, führt zu einem ähnlichen Verteilungsmuster wie die ASMA-Färbung und bestätigt die dargestellte Verteilung der myoepithelialen Zellen in der Speicheldrüse.

3.1.3. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten in der adulten, normalen, menschlichen Speicheldrüse

Die Beurteilung der Färbeintensität und Merkmalsausprägung erfolgt nach dem in 2.6. dargestellten Bewertungsmaßstab.

Eine starke immunhistochemische Färbung der α 1-Kette des Laminins kann in den Basalmembranen der serösen und mukösen Drüsenazini gesehen werden, wogegen die der Schaltstücke, der Streifenstücke und der Ausführungsgänge schwach gefärbt sind.

Während die Azini eine starke Färbung der α 2-Kette erfahren, kann in den duktaalen Strukturen hinsichtlich dieser Färbung eine unterschiedliche Reaktion beobachtet werden.

Die $\alpha 2$ -Kette stellt sich in den Schaltstücken und Streifenstücken mit geringer Färbung dar, wogegen die Ausführungsgänge keine Färbung hinsichtlich der $\alpha 2$ -Kette zeigen.

In den Azini und in den Schaltstücken erfolgt eine mäßige immunhistochemische Färbung der Lamininkette $\alpha 3$. Im restlichen Gangsystem der Speicheldrüse dagegen ist eine geringe Färbung in den Streifenstücken und eine starke Färbung in den Ausführungsgängen bezüglich dieser Kette zu erkennen.

Die $\alpha 5$ -Kette des Laminins zeigt ein ubiquitäres Auftreten in allen untersuchten Basalmembranstrukturen der Speicheldrüse, welche durch eine starke Reaktion dargestellt werden.

Die immunhistochemische Färbung der $\beta 1$ -Kette erfolgt in den azinären Strukturen stärker (starke Färbung) als in den Gangstrukturen, in denen die $\beta 1$ -Kette in den Schaltstücken und Streifenstücken mit mäßiger Färbung in Erscheinung tritt. In den Ausführungsgängen dagegen läßt sich diese Kette nicht darstellen.

Die Basalmembranen des gesamten Gangsystems weisen eine starke Reaktion gegenüber der $\beta 2$ -Kette auf, während die Basalmembranen der Azini nur schwach dargestellt werden.

Bezüglich des Auftretens der Lamininkette $\beta 3$ kann im Verlauf von den Azini bis zu den Ausführungsgängen ein vermehrtes Vorkommen dieser Kette beschrieben werden. Dieser Gradient führt von einer schwachen Färbung in den Azini über eine mäßige Reaktion in den Schaltstücken und Streifenstücken bis hin zu einer starken Färbung in den Ausführungsgängen.

Die Basalmembranen der Azini und der Schaltstücke weisen eine moderate Färbung bezüglich der Lamininkette $\gamma 1$ auf, während die Kette im restlichen Gangsystem nur eine geringe Reaktion zeigt.

Die $\gamma 2$ -Kette erfährt in den Azini und den Schaltstücken nur eine schwache Reaktion und ist in den Streifenstücken mäßig stark vertreten. Hingegen ist die $\gamma 2$ -Kette in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse von starker Präsenz.

Die Verteilung der Lamininketten $\alpha 4$ sowie $\gamma 3$ wird nicht untersucht, da diese Ketten nicht basalmembranassoziiert beschrieben wurden (Vgl. Tabelle 2).

Tabelle 5. Semiquantitative Bewertung der Färbeintensität der extrazellulären Matrixmoleküle in der menschlichen Speicheldrüse

ECM-Moleküle		Histologische Strukturen			
		Azini	Schaltstücke	Streifenstücke	Ausführungsgänge
ASMA		+++	+	+	+
Caldesmon		+++	+	+	+
Kollagen Typ IV		+++	+++	+++	+++
Laminin-Ketten	LN α 1	+++	+	+	+
	LN α 2	+++	+	+	-
	LN α 3	++	++	+	+++
	LN α 5	+++	+++	+++	+++
	LN β 1	+++	++	++	-
	LN β 2	+	+++	+++	+++
	LN β 3	+	++	++	+++
	LN γ 1	++	++	+	+
	LN γ 2	+	+	++	+++

- keine immunhistochemische Färbung
- + schwache immunhistochemische Färbung, punktförmig gefärbte Abschnitte der BM
- ++ mäßige immunhistochemische Färbung, konfluierend gefärbte Abschnitte der BM
- +++ starke immunhistochemische Färbung, vollständig gefärbte BM

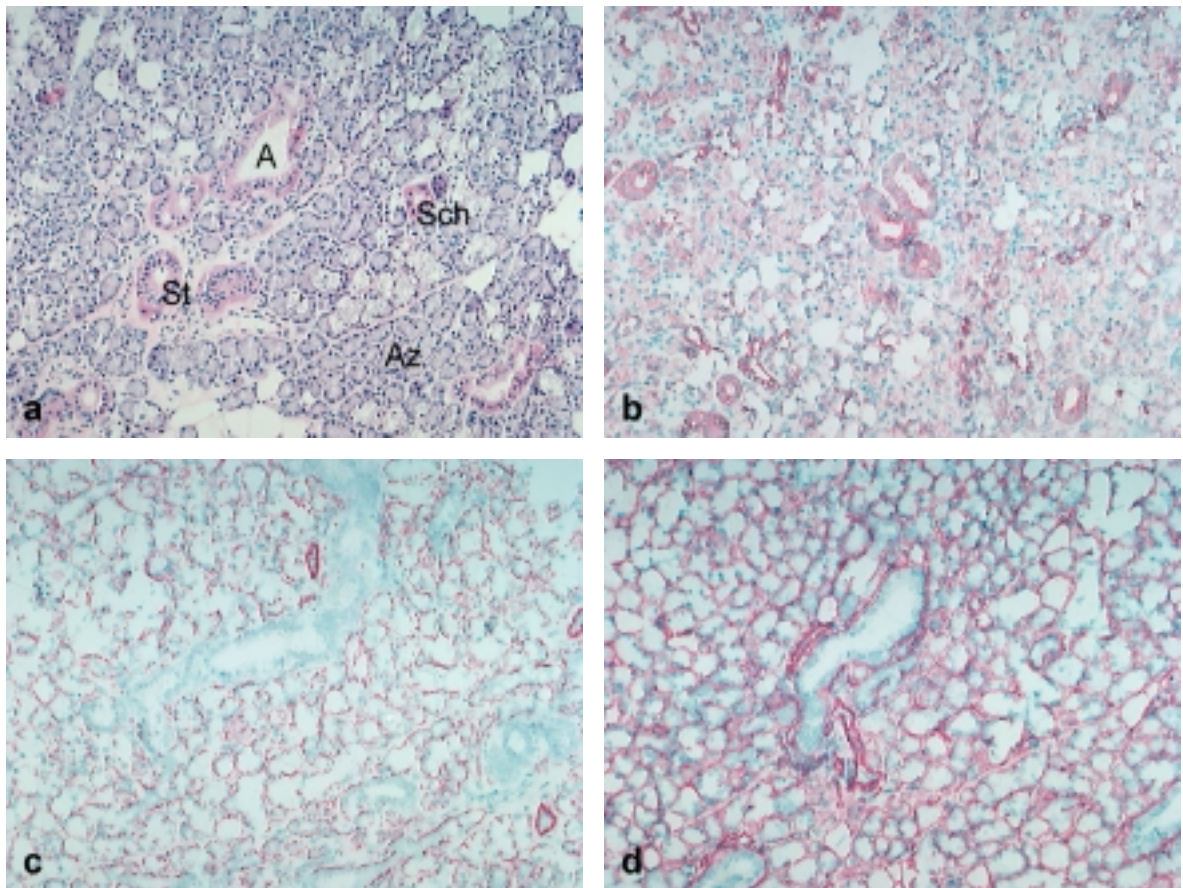


Abbildung 1. Gesunde Speicheldrüse

- (a) Repräsentativer Ausschnitt aus einer humanen Speicheldrüse (Glandula submandibularis)
Darstellung eines Ausführungsganges (A), eines Schaltstückes (Sch) sowie von Streifenstücken (St), welche von azinären Strukturen (Az) umgeben werden (HE, x10)
- (b) Darstellung zytokeratinmarkierter epithelialer Zellen der azinären und dukталen Anteile der menschlichen Speicheldrüse (x10)
- (c) Die immunhistochemische Darstellung von ASMA (α -smooth-muscle-actin) erfolgt in den myoepithelialen Zellen, welche zirkulär um die Azini angeordnet sind. Um die dukталen Strukturen erfolgt lediglich ein spotförmiger Nachweis von ASMA. Außerdem ist eine kräftige Darstellung von Gefäßen zu erkennen (x10).
- (d) Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ IV zeigt kontinuierlich gefärbte Basalmembranen sowohl um die Azini als auch um die Ductuli (x10).

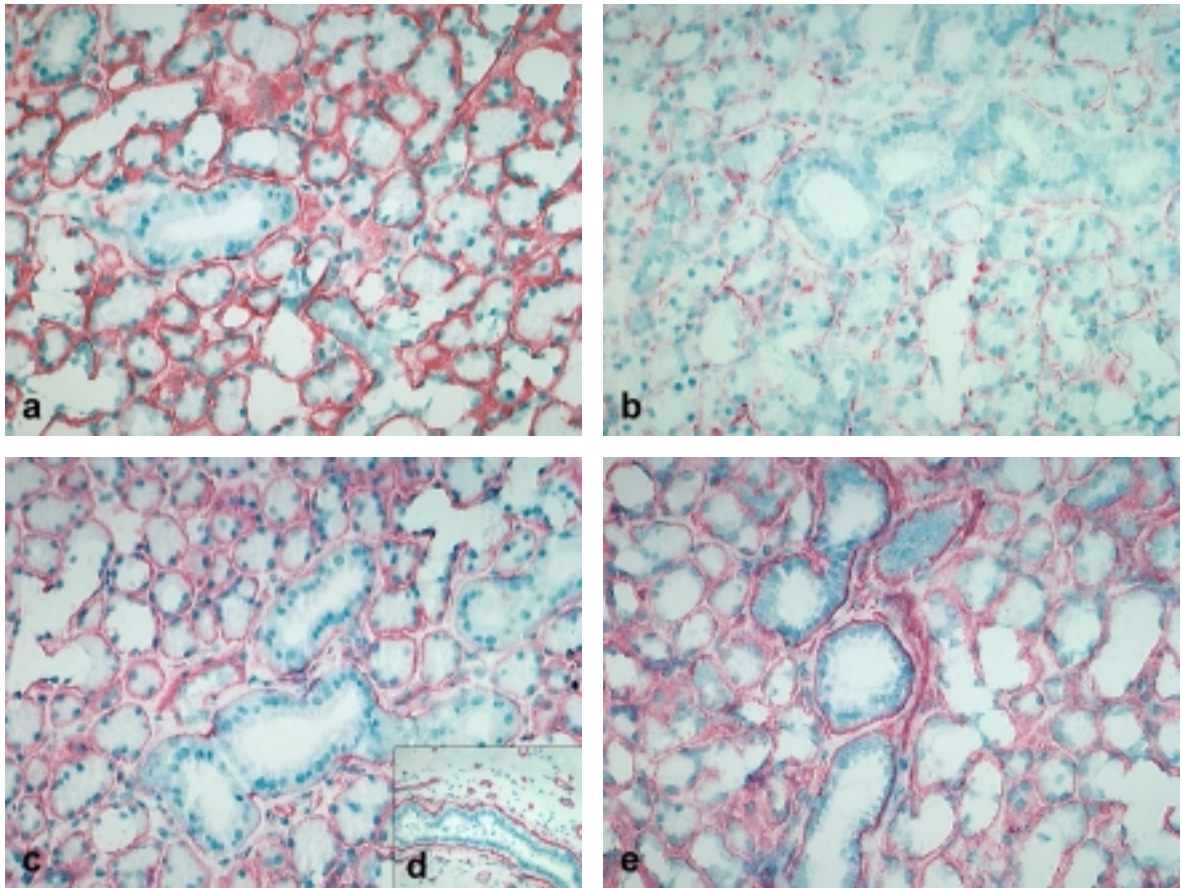


Abbildung 2. Gesunde Speicheldrüse

- (a) Die immunhistochemische Darstellung der Lamininkette $\alpha 1$ zeigt eine starke Basalmembranfärbung der Azini sowie eine unterbrochene Immunfärbung der Basalmembranen der Gangabschnitte (x10).
- (b) Die azinären Strukturen besitzen zarte, zirkulär gefärbte Basalmembranmarkierungen bezüglich der $\alpha 2$ -Kette der Laminine, wogegen die Streifenstücke Unterbrechungen zeigen (x10).
- (c) Die Streifenstücke zeigen hinsichtlich der $\alpha 3$ -Färbung Diskontinuitäten in der Basalmembranzone, während die Azini in der Basalmembranzone zirkulär gefärbt sind (x10).
- (d) Der große Ausführungsgang der Speicheldrüse weist eine starke, durchgängige Darstellung der Lamininkette $\alpha 3$ auf (x10).
- (e) Die immunhistochemische Färbung der $\alpha 5$ -Kette erfolgt ubiquitär in den Basalmembranen aller Drüsenbestandteile (x10).

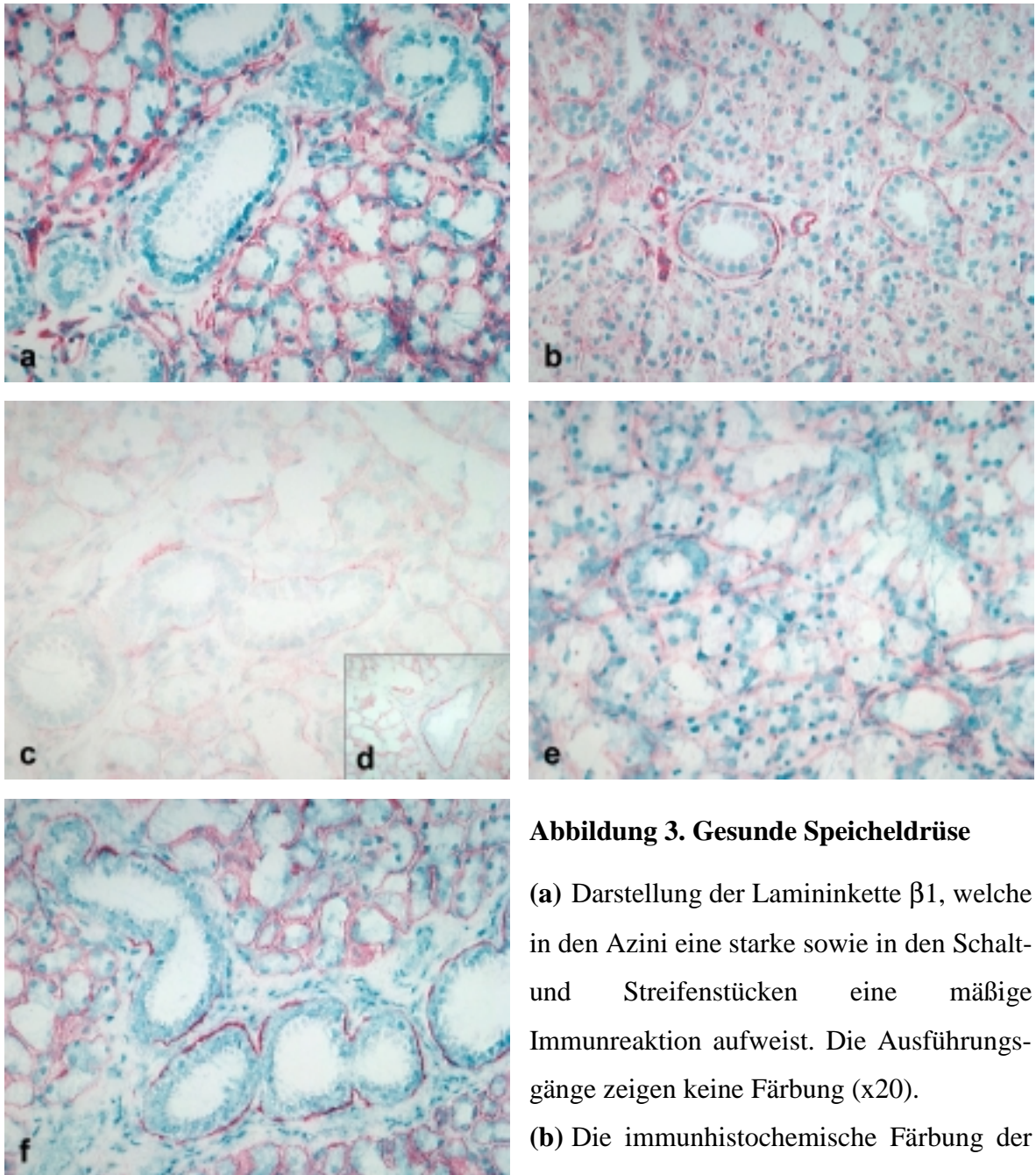


Abbildung 3. Gesunde Speicheldrüse

(a) Darstellung der Lamininkette $\beta 1$, welche in den Azini eine starke sowie in den Schalt- und Streifenstücken eine mäßige Immunreaktion aufweist. Die Ausführungsgänge zeigen keine Färbung (x20).

(b) Die immunhistochemische Färbung der Lamininkette $\beta 2$ erfolgt in den Azini nur spotförmig, wogegen alle dukталen Drüsenabschnitte eine kontinuierliche Basalmembrandarstellung aufweisen (x20).

(c), (d) Die $\beta 3$ -Kette zeigt eine kontinuierlich stärker werdende Reaktion von den Azini (c, schwache Reaktion) bis zu den Ausführungsgängen (d, starke Reaktion) (x20).

(e) Es ist zu erkennen, daß der Nachweis der $\gamma 1$ -Kette in den Azini etwas stärker als in den Gangabschnitten erfolgt, welche nur eine schwache Färbung aufweisen (x20).

(f) Die Darstellung der $\gamma 2$ -Kette zeigt intensiv gefärbte Streifenstücke, welche jedoch einige Unterbrechungen aufweisen sowie schwach dargestellte Azini (x20).

3.2. Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich Histologie, Differenzierungs- markern und Lamininketten am Warthin-Tumor

3.2.1. Histopathologische Strukturen des Warthin-Tumors und Darstellung der Basalmembranen mittels Kollagen Typ IV

Der histopathologische Aufbau des Warthin-Tumors ist durch zwei gewebliche Komponenten gekennzeichnet. Zum Einen ist dies eine epitheliale Komponente, die aus doppelreihig angeordneten onkozytären Zellen gebildet wird. Der Epithelverband ist auf einer Basalmembran fest verankert und bildet unterschiedlich große zystische Hohlräume. Der zweite Bestandteil, der am Aufbau des Tumors beteiligt ist, wird durch eine variable Stromakomponente aus lymphoidem Gewebe gebildet, welches Ähnlichkeit mit dem lymphatischen Gewebe des Waldeyer'schen Rachenringes des Pharynx aufweist.

Im Folgenden wird die Basalmembran, auf welcher das onkozytische Epithel aufsitzt, mittels monoklonaler Antikörper gegen die Lamininketten, analog den Untersuchungen an der gesunden Speicheldrüse, bewertet.

Die Basalmembran wird mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das Kollagen Typ IV dargestellt, um die Basalmembranregion für nachfolgende semiquantitative Bewertungen der Lamininketten beurteilen zu können. Die Darstellung des Kollagen Typ IV ergibt eine gleichmäßige, starke immunhistochemische Färbung bezüglich dieses Basalmembranbestandteiles. Die Basalmembranen weisen keine Unterbrechungen beziehungsweise Defekte auf.

3.2.2. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten in der Basalmembran des Warthin-Tumors

In der Basalmembran des Warthin-Tumors können alle untersuchten Lamininketten mit unterschiedlicher Färbeintensität nachgewiesen werden. Die Beurteilung der Färbeintensität erfolgt nach dem in 2.6. dargestellten Bewertungsmaßstab.

Eine starke immunhistochemische Färbung erfolgt während der Reaktion der monoklonalen Antikörper gegen die Lamininketten $\alpha 1$ und $\alpha 3$, wogegen für die $\alpha 2$ -Kette des Laminins nur eine sehr geringe Reaktion zu beobachten ist.

Im Weiteren erfolgt die Darstellung der $\alpha 5$ -Kette des Laminins durch eine starke Färbung während der Untersuchungen mittels der APAAP-Methode.

Aus der Reihe der untersuchten Laminin- β -ketten, also der Ketten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$, weisen alle durch eine starke immunhistochemische Reaktion auf ein verstärktes Vorkommen dieser Ketten in der Basalmembran hin.

Die Lamininkette $\gamma 1$ läßt sich in der Basalmembran nur mit einer mäßig starken Immunreaktion nachweisen und ist somit nur in geringer Menge in den Basalmembranstrukturen des Warthin-Tumors vertreten.

Die $\gamma 2$ -Kette des Laminins läßt sich gegenüber der $\gamma 1$ -Kette mit einer intensiven, starken immunhistochemischen Färbung darstellen und tritt infolgedessen in einem stärkeren Maße in der Basalmembran auf.

Die Darstellungen der Differenzierungsmarker ASMA (α -smooth-muscle-actin) beziehungsweise Caldesmon weisen durch eine fehlende Immunreaktion gegenüber den entsprechenden monoklonalen Antikörpern auf eine völlige Abwesenheit dieser Moleküle in der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors hin.

3.2.3. Qualitative und semiquantitative Bewertung der Immunreaktionen der Lamininketten im lymphoiden Stroma des Warthin-Tumors

Von den untersuchten Lamininketten können mit Ausnahme der $\alpha 1$ -Kette alle anderen Lamininketten mittels immunhistochemischer Färbung in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben werden.

Eine sehr starke Färbung läßt sich für die $\alpha 3$ -Kette erkennen, während aus der Färbung der $\alpha 2$ -Kette sowie der $\alpha 5$ -Kette des Laminins nur eine schwache Reaktion resultiert.

Während für die Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ eine starke immunhistochemische Reaktion zu erkennen ist, ist die $\beta 3$ -Kette des Laminins nur mit einer mäßigen, moderaten Färbung darstellbar.

Die Basalmembran zeigt eine mäßig starke Reaktion auf die spezifischen Antikörper gegen die Lamininkette $\gamma 1$, wogegen die $\gamma 2$ -Kette mittels der Immunfärbung nur in sehr geringem Ausmaß darstellbar ist.

Mit der immunhistochemischen Färbung des muskelspezifischen Aktin (ASMA) erfolgt im gesamten lymphoiden Stroma keine Färbung.

Im Gegensatz hierzu kann das ebenfalls muskelspezifische Molekül Caldesmon in der Stromakomponente des Warthin-Tumors mit einer schwachen Immunfärbung dargestellt werden.

Tabelle 6. Semiquantitative Bewertung der Färbeintensität der extrazellulären Matrixmoleküle im Warthin-Tumor der Speicheldrüse

ECM-Moleküle		Epitheliale Basalmembran	Lymphoides Stroma
ASMA		-	-
Caldesmon		-	+
Kollagen Typ IV		+++	+++
Laminin-Ketten	LN $\alpha 1$	+++	-
	LN $\alpha 2$	+	+
	LN $\alpha 3$	+++	+++
	LN $\alpha 5$	+++	+
	LN $\beta 1$	+++	+++
	LN $\beta 2$	+++	+++
	LN $\beta 3$	+++	++
	LN $\gamma 1$	++	++
	LN $\gamma 2$	+++	+

- keine immunhistochemische Färbung
- + schwache immunhistochemische Färbung, punktförmig gefärbte Abschnitte der BM
- ++ mäßige immunhistochemische Färbung, konfluierend gefärbte Abschnitte der BM
- +++ starke immunhistochemische Färbung, vollständig gefärbte BM

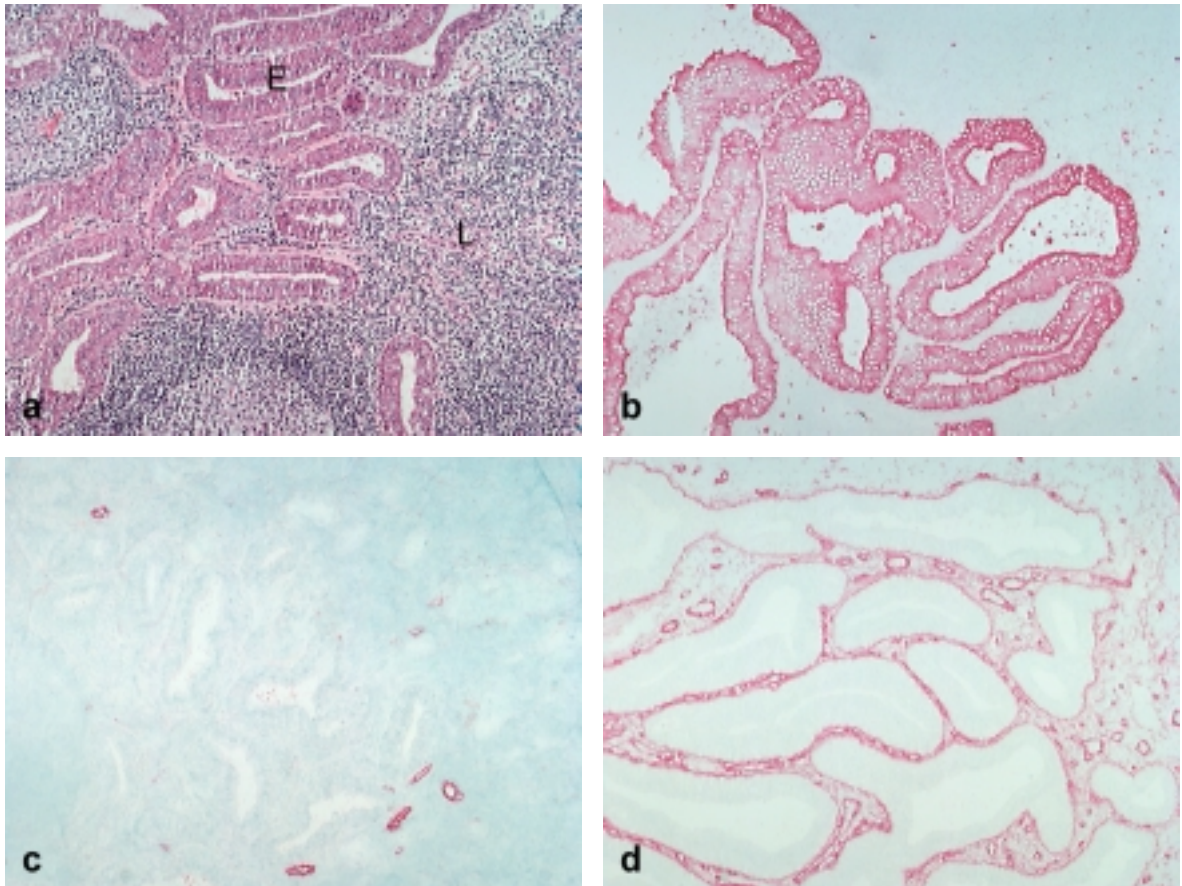


Abbildung 4. Warthin-Tumor

(a) Repräsentativer Ausschnitt aus einem Warthin-Tumor

Zu erkennen ist das zweireihige onkozytäre Epithel (E), welches zystische Hohlräume umfaßt sowie das organoide, lymphatische Stroma mit Sekundärfollikeln (L) (HE, x10).

(b) Darstellung der epithelialen Tumorkomponente mittels immunhistochemischer Zytokeratinmarkierung (x10)

(c) Der Nachweis von ASMA (α -smooth-muscle-actin) erfolgt lediglich um einzelne Gefäße, eine myoepitheliale Komponente fehlt. Die epitheliale Komponente sowie der Stromaanteil weisen keine immunhistochemische Färbung auf (x10).

(d) Die immunhistochemische Darstellung des Kollagen Typ IV läßt durchgängig gefärbte Basalmembranen erkennen, wobei auch im lymphatischen Stroma kräftig markierte Basalmembranstrukturen auftreten (x10).

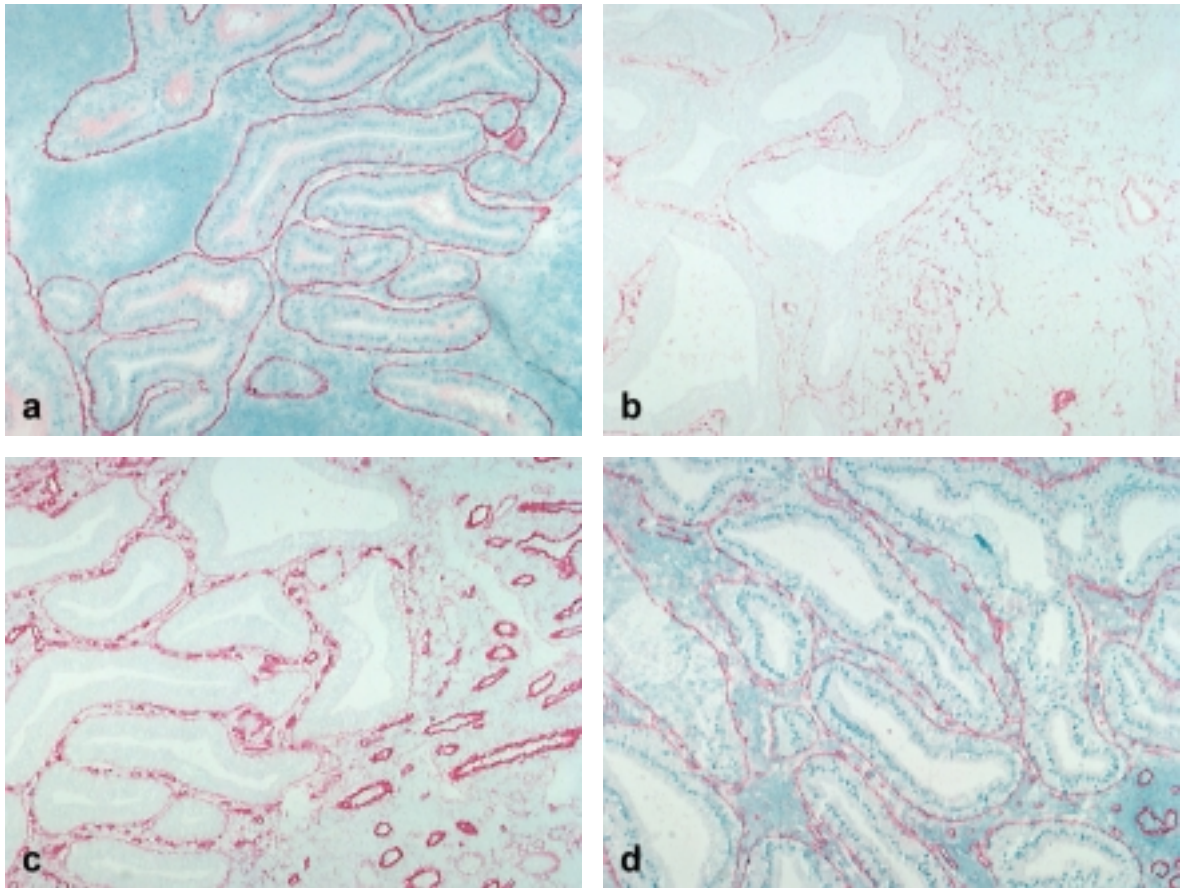


Abbildung 5. Warthin-Tumor

- (a) Die immunhistochemische Färbung der Lamininkette $\alpha 1$ zeigt kontinuierlich gefärbte Basalmembranen, wobei die Stromakomponente bezüglich dieser Kette keine Färbung erfährt (x10).
- (b) Mittels der Darstellung der $\alpha 2$ -Kette der Laminine lassen sich nur bruchstückhaft gefärbte Basalmembranabschnitte erkennen. Das Stroma zeigt ebenfalls eine geringgradige Färbung von Basalmembransegmenten (x10).
- (c) Die epithelialen Basalmembranen des Warthin-Tumors lassen sich durch Immunfärbung der Lamininkette $\alpha 3$ durchgängig darstellen. Das Stroma weist ebenfalls eine Immunreaktion auf. Im Weiteren sind stark gefärbte Gefäße erkennbar (x10).
- (d) Die Lamininkette $\alpha 5$ wird immunhistochemisch in der gesamten Basalmembran durchgängig veranschaulicht. Im Stroma sowie in vereinzelt Gefäßen ist die Kette ebenfalls nachweisbar (x10).

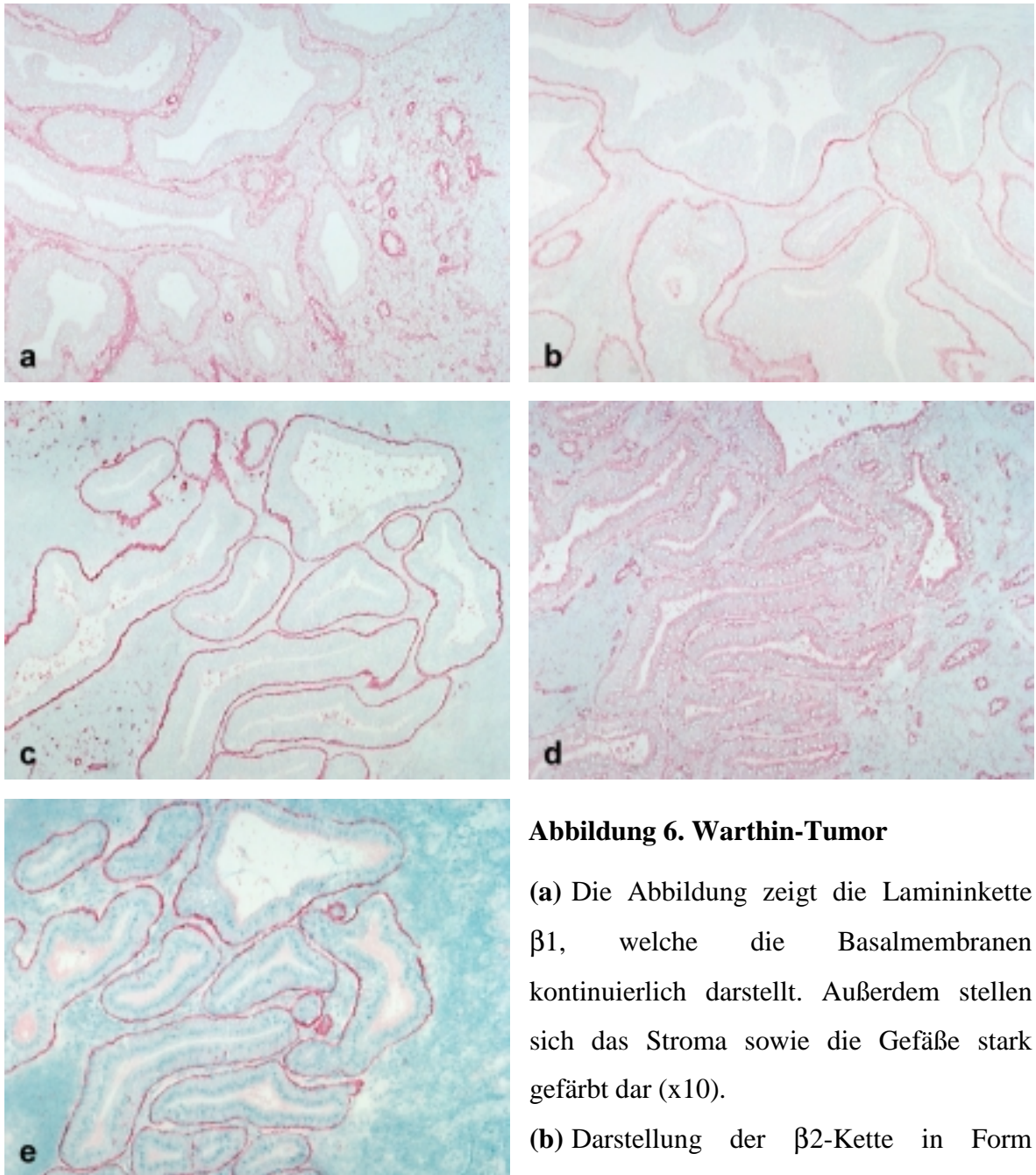


Abbildung 6. Warthin-Tumor

(a) Die Abbildung zeigt die Lamininkette $\beta 1$, welche die Basalmembranen kontinuierlich darstellt. Außerdem stellen sich das Stroma sowie die Gefäße stark gefärbt dar (x10).

(b) Darstellung der $\beta 2$ -Kette in Form durchgängiger Basalmembranen

Die lymphatische Stromakomponente weist dagegen keine Färbung auf (x10).

(c) Die Abbildung läßt die immunhistochemische Reaktion der Lamininkette $\beta 3$ erkennen, die zu einer intensiven Darstellung der Basalmembranen führt. Das Stroma weist eine moderate Reaktion auf (x10).

(d) Die Basalmembranen im Warthin-Tumor stellen sich bezüglich der Reaktion der $\gamma 1$ -Kette mäßig stark dar. Stroma und Gefäße zeigen eine moderate Färbung (x10).

(e) Die Darstellung der $\gamma 2$ -Kette erfolgt ausschließlich in den epithelialen Basalmembranstrukturen, welche kräftig als kontinuierliche Linie dargestellt werden (x10).

3.3. Das Verteilungsmuster der Lamininketten im pleomorphen Adenom

Die Bewertung der Lamininkettenverteilung im pleomorphen Adenom erfolgt qualitativ nach dem in 2.7. dargestellten Bewertungsmaßstab.

Es wird hierbei eine Unterteilung der Laminindeposition in durchgängigen Basalmembranen (1) beziehungsweise Basalmembransegmenten (2) von einer spotförmigen (3) sowie einer intrazellulären Deposition (4) der Lamininketten unterschieden. 0 entspricht keiner immunhistochemischen Färbung.

Nachfolgende Tabelle veranschaulicht die jeweilige Lamininverteilung in den verschiedenen differenzierten Arealen im pleomorphen Adenom. Die zellulären Differenzierungsrichtungen sind der Tabelle ebenfalls zu entnehmen. Es wird die Verteilung der Lamininketten in tubulär und basalzellig differenzierten sowie in spindelzellig-soliden und spindelzellig-myxoiden Tumorarealen verglichen.

Tabelle 7. Semiquantitative Bewertung des Färbeumfangs und der Färbeintensität der extrazellulären Matrixmoleküle im pleomorphen Adenom der Speicheldrüse

ECM-Moleküle		Zelluläre Differenzierung			
		tubulär	basalzellig	spindelzellig-solid	spindelzellig-myxoid
ASMA		3	3	3	0
Kollagen IV		1, 2	1, 2	2, 3	2, 3
Laminin-Ketten	LN α 1	2	1	0	0
	LN α 2	2	2, 3	3	3
	LN α 3	1	1	3	0
	LN α 5	2	1, 2, 3	3	3
	LN β 1	1, 2	1, 2, 3	2, 3	2, 3, 4
	LN β 2	2	1, 2, 3	2, 3	3
	LN β 3	1	3	3	0
	LN γ 1	2	2, 3	2, 3	3
	LN γ 2	1	3	3	0

- 1 durchgängige Basalmembranen
- 2 Basalmembransegmente
- 3 Spotförmige Deposition
- 4 Intrazelluläre Deposition

Prinzipiell läßt sich anhand der dargestellten Verteilung der Lamininketten feststellen, daß alle untersuchten Lamininketten in allen pleomorphen Adenomen in unterschiedlicher Intensität und in Abhängigkeit der jeweiligen zellulären Differenzierung nachgewiesen werden können.

Bei der Betrachtung des Verteilungsmusters der Lamininketten fällt auf, daß in Abhängigkeit der zellulären Differenzierung im pleomorphen Adenom bestimmte Basalmembranformationen vorherrschen.

Die tubulär differenzierten Tumorareale zeigen im Wesentlichen eine anhand der Verteilung der Lamininketten sowie des Kollagen Typ IV dargestellte durchgängige Basalmembranstruktur beziehungsweise ein Auftreten in Form segmentaler Basalmembranen. Dieses Verteilungsmuster trifft für alle Lamininketten gleichermaßen zu. Die basalzellige Differenzierungsrichtung dagegen zeigt neben strukturierten Basalmembranen, wie sie auch in den tubulären Abschnitten auftreten, zusätzlich ein ungeordnet nachweisbares Vorkommen der untersuchten Lamininketten, welche spotförmig um die Basalzellen angeordnet sind.

Der spindelzellig-solide Zelltyp zeigt in seiner direkten Umgebung kaum noch etwas von der organisierten Basalmembranstruktur. Die Tumorareale mit dieser Differenzierung sind durch ein Auftreten von größtenteils spotförmigen Laminin- bzw. Kollagenvorkommen geprägt und enthalten nur Basalmembranbruchstücke. Auffällig ist, daß von diesen Zellen nicht alle Lamininketten gleichermaßen exprimiert werden. So ist ein vollständiges Fehlen der Lamininkette $\alpha 1$ zu verzeichnen.

Der spindelzellig-myxoide Stromabereich weist ein fast vollständiges spotförmiges Vorkommen der Lamininketten auf. Es sind hier lediglich mittels des Nachweises der Lamininkette $\beta 1$ sowie der Kollagen Typ IV-Färbung vereinzelte Basalmembranbruchstücke darzustellen. Einige Lamininketten werden in diesem Tumorabschnitt überhaupt nicht exprimiert. Hierzu zählen die Ketten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 3$ sowie $\gamma 2$.

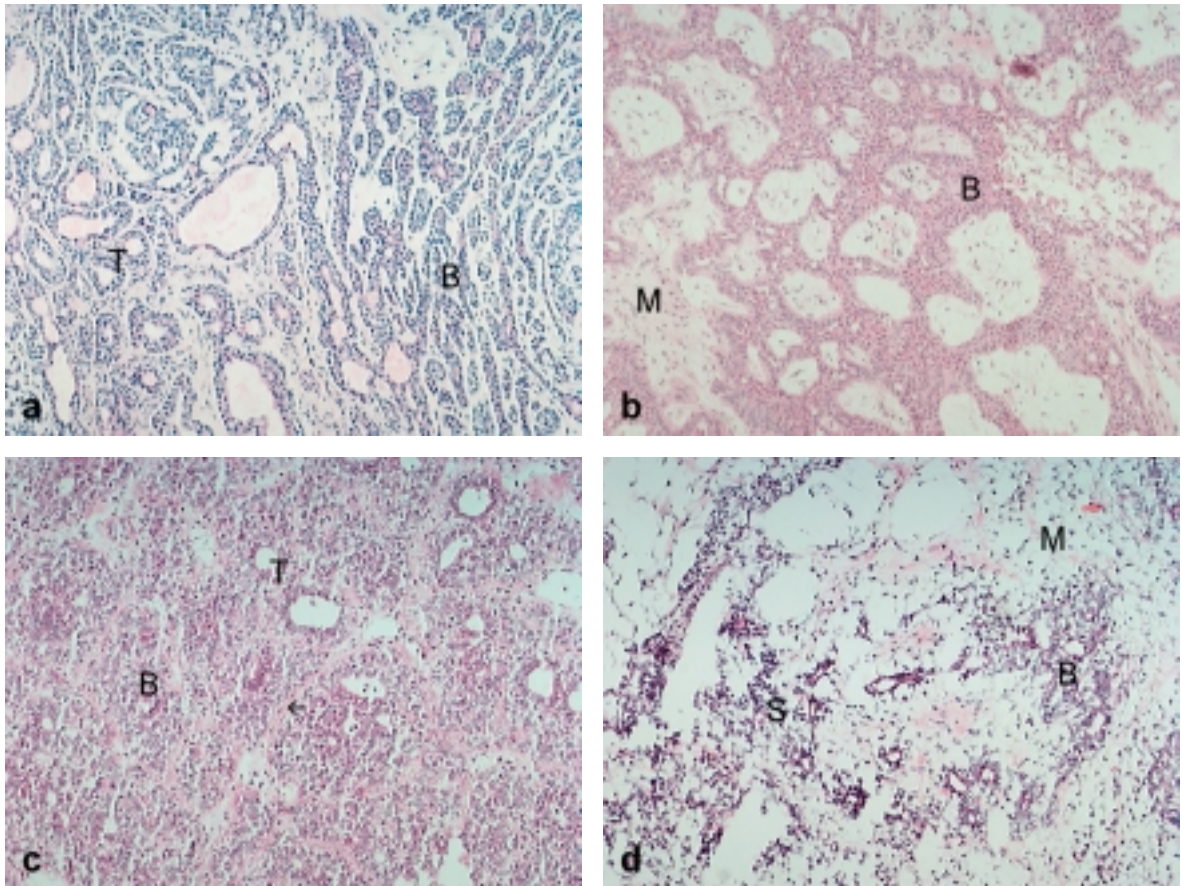


Abbildung 7. Pleomorphe Adenome – Die Vielfalt im histopathologischen Erscheinungsbild

- (a) Darstellung eines repräsentativen Ausschnittes aus einem pleomorphen Adenom, welches neben der basalzelligen (B) teilweise auch eine tubuläre (T) Differenzierung aufweist (HE, x10)
- (b) HE-Färbung eines weiteren pleomorphen Adenoms, das charakteristische Basalzellstränge (B) enthält
Außerdem ist eine spindelzellig-myxoide Stromakomponente (M) dargestellt (HE, x10).
- (c) Die Abbildung zeigt wiederum basalzellig differenzierte Zellen (B), die ungeordnet erscheinen, sowie einige tubuläre Strukturen (T) und eine Eosinophilie in der epithelialen Basalmembranregion (↔) (HE,x10).
- (d) Auf der Abbildung ist in HE-Färbung ein pleomorphes Adenom mit überwiegend spindelzellig-myxoider Differenzierung zu erkennen (M), in dem weiterhin Abschnitte mit basalzelliger (B) und spindelzellig-solider Differenzierung (S) zu unterscheiden sind (HE, x10).

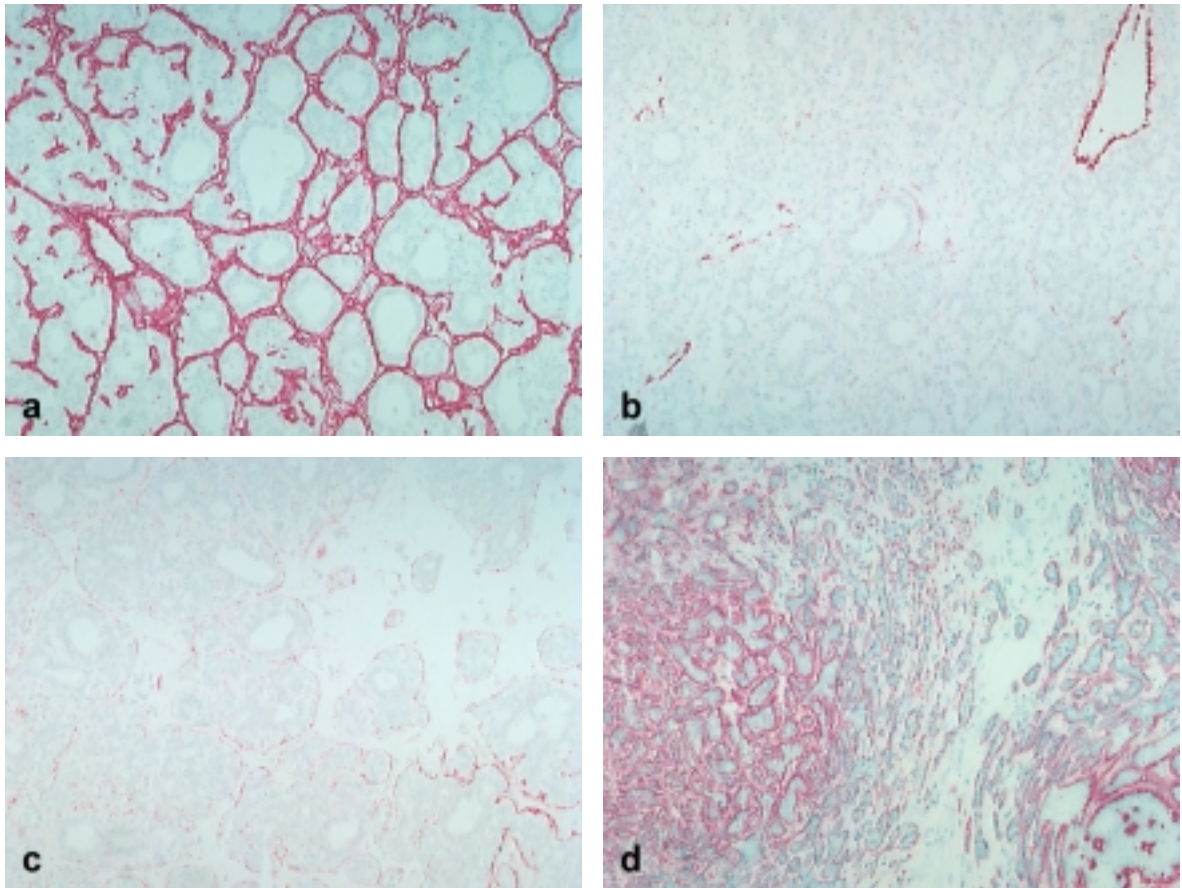


Abbildung 8. Pleomorphes Adenom mit basalzellig-tubulärer Differenzierung

- (a) Die Darstellung von Kollagen Typ IV zeigt durchgängig gefärbte Basalmembranen, wobei auch das Stroma kräftig gefärbt erscheint (x10).
- (b) Die immunhistochemische Färbung von ASMA (α -smooth-muscle-actin) erfolgt lediglich herdförmig und zeigt kein Muster. In der Abbildung ist außerdem ein ASMA-markiertes Gefäß zu erkennen (x10).
- (c) Die Lamininkette $\alpha 2$ läßt sich stellenweise als durchgängig gefärbte Basalmembranabschnitte darstellen, wobei in anderen Arealen keinerlei Markierung verzeichnet werden kann (x10).
- (d) Am Beispiel der Darstellung der $\gamma 2$ -Kette lassen sich unterschiedliche Färbemuster erkennen. Neben kräftig gefärbten Abschnitten erkennt man in direkter Nachbarschaft einige nur segmentförmig dargestellte Areale (x10).

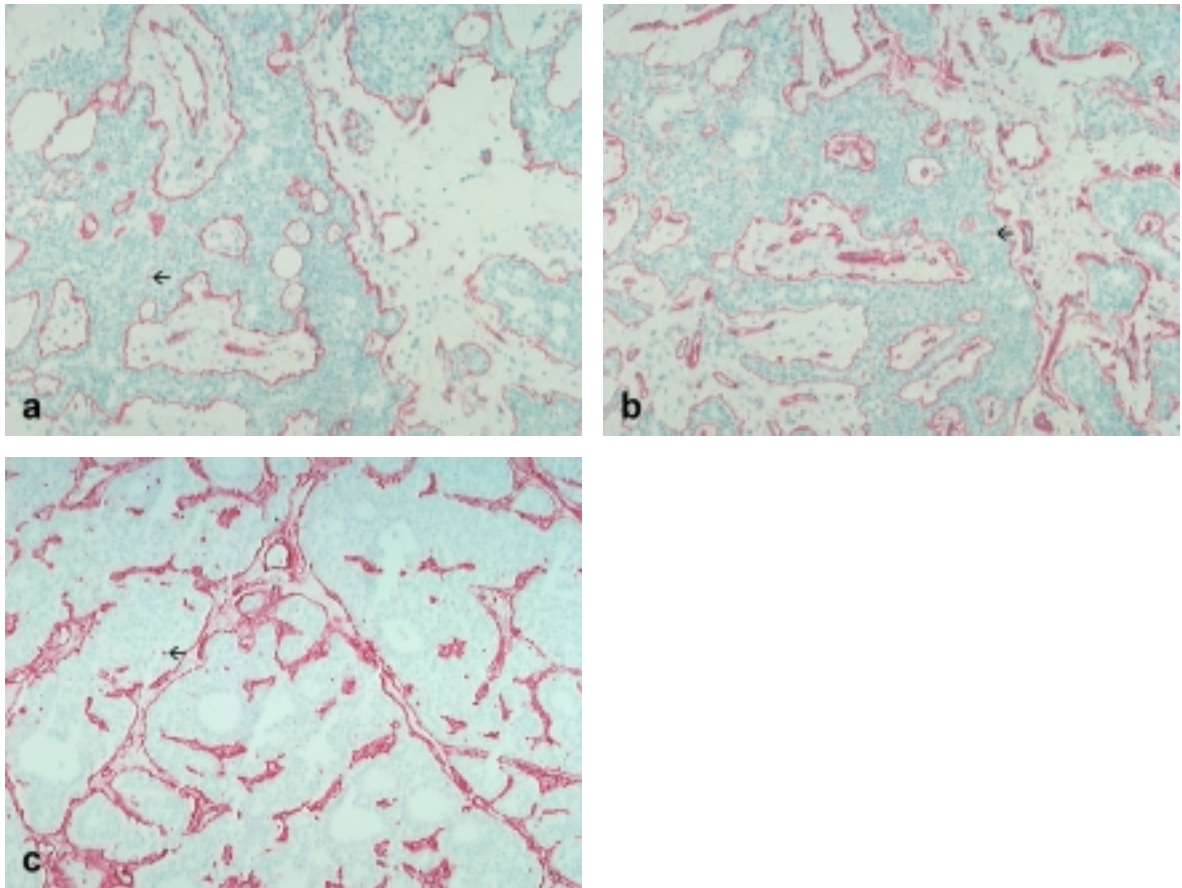


Abbildung 9. Pleomorphes Adenom mit basalzellig-tubulärer Differenzierung

- (a), (b) Die immunhistochemischen Färbungen der Lamininketten $\alpha 3$ (a) sowie $\alpha 5$ (b) zeigen ein nahezu identisches Verteilungsmuster dieser Ketten. Um die basalzellig differenzierten Zellstränge sind kontinuierlich gefärbte Basalmembranen zu erkennen, wobei im Inneren dieser Kompartimente vereinzelt punktförmige Basalmembrandepotionen dargestellt sind (\leftarrow) (x10).
- (c) Die $\beta 1$ -Kette stellt sich einerseits in Form von durchgängigen Basalmembranen dar, zum Anderen jedoch außerdem als spotförmige Depositionen innerhalb der Epithelformationen (\leftarrow) (x10).

Anhand des beispielhaften Verteilungsmusters der Lamininketten $\alpha 3$, $\alpha 5$ sowie $\beta 1$ läßt sich der mögliche Gewebsbildungsprozeß veranschaulichen, wonach die Basalzellen als pluripotente Zellen Basalmembranmaterial produzieren, welches zunächst ungeordnet als punktförmige Färbungen erscheint. Später erfährt dieses Basalmembranmaterial in der Peripherie der basalzelligen Formationen eine zunehmende Ordnung in Form kontinuierlicher Basalmembranen.

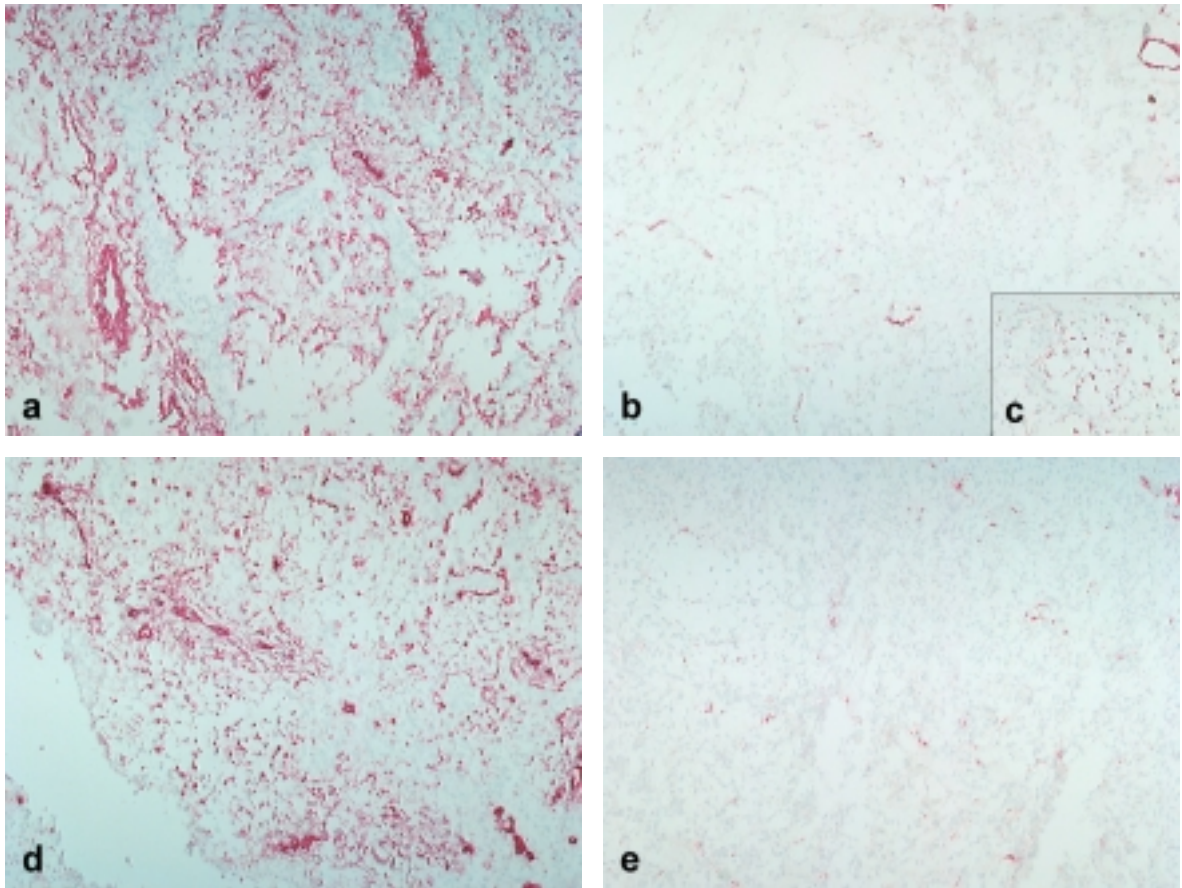


Abbildung 10. Pleomorphes Adenom mit spindelzelliger Differenzierung

- (a) Das Depositionsmuster von Kollagen Typ IV läßt sich als größtenteils spot- bis segmentförmig beschreiben und zeigt teilweise bruchstückartige Basalmembranabschnitte (x10).
- (b) Die Darstellung von ASMA (α -smooth-muscle-actin) erfolgt nur in vereinzelten Zellen. Der größte Teil dieses pleomorphen Adenoms stellt sich ASMA-negativ dar und enthält somit nur wenige Myoepithelzellen (x10).
- (c) Die immunhistochemische Färbung der Lamininkette $\alpha 2$ erweist sich als umfangreicher als die von ASMA. Sie zeigt jedoch ebenfalls nur ein herdförmiges Verteilungsmuster und keine basalmembranartige Deposition (x10).
- (d) Der Nachweis der $\beta 1$ -Kette zeigt ein diskontinuierliches, segmentförmiges Basalmembranmuster (x10).
- (e) Die Lamininkette $\gamma 2$ ist in diesem spindelzellig-differenzierten pleomorphen Adenom in nur geringem Maße vertreten. Es zeigt sich lediglich eine geringe punktförmige Immunreaktion (x10).

4. Diskussion

4.1. Die Lamininisoformen in der menschlichen Speicheldrüse

Nachdem in der menschlichen Niere und dem menschlichen Hoden eine unterschiedliche Lamininkettenverteilung beschrieben wurde (Virtanen et al. 1995a; Virtanen et al. 1997; Böttcher 1999), kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Basalmembranen in der menschlichen Speicheldrüse ebenfalls eine Heterogenität bezüglich der Verteilung der verschiedenen Lamininketten beziehungsweise der Lamininisoformen besitzen.

Es können Unterschiede im Nachweis der Lamininisoformen zwischen den Basalmembranen der Drüsenzini und der dukталen Strukturen dargestellt werden, so daß diese Heterogenität der Verteilung der Lamininisoformen wohl als ein allgemeines Prinzip in duktoazinären Einheiten angesehen werden kann.

Es ist infolgedessen von einer funktionellen Gliederung innerhalb der duktoazinären Einheiten auszugehen, wobei bestimmten Abschnitten dieser Einheit spezifische Funktionen zugeordnet sind. Diese Spezialisierung der einzelnen Abschnitte bedingt wiederum ein spezifisches Verteilungsmuster der Lamininisoformen in der Basalmembran der duktoazinären Einheit.

Dieses allgemeine Prinzip wurde schon für die Molekülfamilie der Zytokeratine als Bestandteil des Zytoskeletts nachgewiesen, so zum Beispiel im Hoden und im Eileiter (Dinges et al. 1991). Da zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix ein funktioneller Zusammenhang besteht, ist die Heterogenität in der Basalmembran-Komposition nur folgerichtig (Bissell et al. 1982).

4.1.1. Die neue Definition des Laminin α 1-Antikörpers sowie die Neu-Interpretation der bisherigen Resultate in der menschlichen Speicheldrüse

Zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Verteilung der Laminin α 1-Kette in verschiedenen Geweben deuteten auf eine weite Verbreitung und eine ubiquitäre

Expression der $\alpha 1$ -Kette in den meisten Basalmembranen hin (Engvall et al. 1990; Sanes et al. 1990; Virtanen et al. 1995b). Diese immunhistochemischen Studien wurden mit dem monoklonalen Antikörper 4C7 durchgeführt, der als spezifisch für die Laminin $\alpha 1$ -Kette charakterisiert wurde (Engvall et al. 1990).

Andere Untersuchungen wiesen jedoch mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung und des Northern blotting auf eine stärkere Beschränkung in der Gewebsverteilung der $\alpha 1$ -Kette des Laminins hin (Nissinen et al. 1991; Vuolteenaho et al. 1994). Man konnte somit das ubiquitäre Vorkommen nicht bestätigen, und es wurde demnach angenommen, daß die $\alpha 1$ -Kette nur in bestimmten Basalmembranen auftritt.

Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die Spezifität dieses Antikörpers zur $\alpha 1$ -Kette kontrovers diskutiert. Miner und Mitarbeiter spekulierten, ob der Antikörper 4C7 nicht noch eine andere Lamininkette, die $\alpha 5$ -Kette, erkennt. Außerdem wurde diskutiert, ob dieser Antikörper die $\alpha 5$ -Kette allein erkennt, oder ob er die $\alpha 1$ - und die $\alpha 5$ -Kette gemeinsam bindet (Miner et al. 1997).

Neuere Studien bewiesen nun, daß der monoklonale Antikörper 4C7 die neu beschriebene Lamininkette $\alpha 5$ erkennt und keine Bindung zur $\alpha 1$ -Kette erfolgt, so daß die ursprünglichen Ergebnisse zur Expression der $\alpha 1$ -Kette neu interpretiert werden müssen. Das Expressionsmuster ist nunmehr der $\alpha 5$ -Kette zuzuordnen (Tiger et al. 1997; Church & Aplin 1998).

Nachdem die Laminin $\alpha 1$ -Kette in der menschlichen Speicheldrüse von Strassburger und Mitarbeitern mittels des Antikörpers 4C7 nachgewiesen wurde, wird in der vorliegenden Arbeit nun ein Antikörper verwendet, der spezifisch die „wahre“ Laminin $\alpha 1$ -Kette bindet (Strassburger et al. 1998).

In dieser Arbeit kann somit erstmals gezeigt werden, daß die $\alpha 1$ -Kette eine stärkere Beschränkung der Expression in der menschlichen Speicheldrüse aufweist als dies in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Caselitz et al. 1988; Skalova & Leivo 1992).

Demnach weisen die Untersuchungen auf eine stärkere Assoziation der $\alpha 1$ -Kette zu den azinären (starke Färbung) als zu den dukталen (mäßige Färbung) Strukturen in der Speicheldrüse hin und können die als gleichmäßig in allen Basalmembranen beschriebene Expression dieser Lamininkette nicht bestätigen.

4.1.2. Die Laminin α 2-Kette als Marker für myoepitheliale Zellen

Die α 2-Kette der Laminine ist bisher in der Herzmuskulatur, der Skelettmuskulatur, den peripheren Nerven und anderen mesenchymalen Geweben beschrieben worden (Vuolteenaho et al. 1994; Malandrini et al. 1997).

In der menschlichen Speicheldrüse kann diese Lamininkette in den Basalmembranen der Drüsenazini nachgewiesen werden, wo sie eine starke immunhistochemische Färbung bedingt. Im Gegensatz dazu läßt sich in den duktalem Strukturen ein sich vermindertes Auftreten dieser Kette entlang dem Gangsystem verzeichnen, wobei in den Ausführungsgängen keine immunhistochemische Reaktion erfolgt.

Im Weiteren wird eine strenge Assoziation zwischen der Verteilung der α 2-Kette und der Färbung des muskelspezifischen Aktin (ASMA) sowie dem für glatte Muskelzellen spezifischen Caldesmon gefunden, die eine enge Korrelation dieser Bestandteile im Bereich der Myoepithelzellen in den Azini zeigt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Lamininkette α 2 einen charakteristischen Bestandteil der myoepithelialen Basalmembranen in der menschlichen Speicheldrüse darstellt.

Nachdem nachgewiesen wurde, daß die α 2-Kette eine entscheidende Funktion in der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Funktion im Skelettmuskel besitzt, kann nun vermutet werden, daß die α 2-Kette auch eine spezifische Rolle für die kontraktile Funktion beziehungsweise der Integrität des Myoepithels im azinären Anteil der Speicheldrüse besitzt (Ryan et al. 1996).

4.1.3. Die Laminin α 5-Kette ist in den epithelialen Basalmembranen der Speicheldrüse ubiquitär nachweisbar

Nachdem die Lamininkette α 5 von (Miner et al. 1997) als Bestandteil der neuen Lamininisofomen 10 und 11 dargestellt wurde, erlangte man die Erkenntnis, daß man mit dem monoklonalen Antikörper 4C7, von dem man annahm, er wäre spezifisch für die Laminin α 1-Kette, eigentlich die neu beschriebene α 5-Kette nachwies (siehe 4.1.1.).

Aufgrund dessen war es nun notwendig, die Ergebnisse, die man aus der Verteilung der $\alpha 1$ -Kette in den Geweben erlangte, neu zu interpretieren als die Verteilung der Laminin $\alpha 5$ -Kette (Tiger et al. 1997).

Seitdem gilt das ursprüngliche Verteilungsmuster der Laminin $\alpha 1$ -Kette als Verteilungsmuster der $\alpha 5$ -Kette in den Geweben, so daß die Lamininkette $\alpha 5$ als weit verbreitet gilt, und sie somit die Haupt-Lamininkette in den, vor allem epithelialen, Basalmembranen der adulten Gewebe darstellt (Miner et al. 1995).

Durbeej und Mitarbeiter nahmen nach Untersuchungen an embryonalen Nieren an, daß die $\alpha 5$ -Kette nicht ubiquitär in allen embryonalen Basalmembranen auftritt, jedoch hauptsächlich dort gefunden werden kann, wo die $\alpha 1$ -Kette gering exprimiert ist. Außerdem kamen sie zu der Erkenntnis, daß die $\alpha 1$ -Kette wohl verstärkt in unreifen und jungen Basalmembranen vorkommt, währenddessen die Expression der $\alpha 5$ -Kette auf die Basalmembranen der reifen Gewebe beschränkt ist (Durbeej et al. 1996).

Im Weiteren konnte nachgewiesen werden, daß die $\alpha 5$ -Kette nicht nur in epithelialen Basalmembranen vorhanden ist, sondern daß sie auch von mesenchymalen Zellen produziert werden kann (Lefebvre et al. 1999).

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann die Expression der Laminin $\alpha 5$ -Kette in der menschlichen Speicheldrüse neu definiert werden. In dieser kann die Verteilung der $\alpha 5$ -Kette in allen histologischen Strukturen nachgewiesen werden, und es wird somit die Beschreibung von Strassburger und Mitarbeitern bestätigt, die ebenfalls eine ubiquitäre Expression der $\alpha 5$ -Kette zeigten, die jedoch damals noch als Lamininkette $\alpha 1$ definiert wurde (Strassburger et al. 1998).

Die Basalmembranen der Drüsenzini und des gesamten Gangsystems weisen eine starke immunhistochemische Reaktion dieser Lamininkette auf.

Aufgrund dieser Untersuchungen an der Speicheldrüse kann bestätigt werden, daß die $\alpha 5$ -Kette als eine in der menschlichen Speicheldrüse weit verbreitete Lamininkette gilt.

4.1.4. Die Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ in der menschlichen Speicheldrüse

Die Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ werden in den verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Expression beschrieben. In fetalem Gewebe gilt die $\beta 2$ -Kette als weit verbreitet, vor allem in Gehirn und Niere, aber auch im Bronchialepithel und in der Leber. Im Gegensatz dazu findet man die $\beta 1$ -Kette exklusiv in der quergestreiften Muskulatur, während man eine Ko-Expression der beiden Lamininketten in den Alveolen und der Bronchialmuskulatur erkennt. Diese Ergebnisse weisen aufgrund der unterschiedlichen Verteilung auf eine unterschiedliche biologische Rolle und Funktion der Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ hin (Iivanainen et al. 1995b).

In reifen Geweben hingegen läßt sich eine starke Verbreitung der $\beta 1$ -Kette in den meisten Basalmembranen darstellen, wogegen die $\beta 2$ -Kette nur in bestimmten Basalmembranen auftritt (Virtanen et al. 1995b).

Im Weiteren haben Wewer und Mitarbeiter die $\beta 2$ -Kette als bevorzugte Lamininkette der Basalmembranen der glatten Muskelzellen von Arterien beschrieben, während in subendothelialen Basalmembranen ein exklusives Auftreten der $\beta 1$ -Kette dargestellt ist (Wewer et al. 1994b).

An diesen Beispielen kann die differentielle Expression und die unterschiedliche Funktion der beiden Lamininketten auch in reifen Geweben beschrieben werden.

In den vorliegenden Untersuchungen an der menschlichen Speicheldrüse kann dieses unterschiedliche Verteilungsmuster der Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ ebenfalls erkannt werden.

Es läßt sich eine starke Verbreitung der $\beta 1$ -Kette in den Drüsenazini sowie eine geringe Positivität in den Basalmembranen der dukталen Strukturen darstellen, wobei allein die Ausführungsgänge keine immunhistochemische Reaktion zeigen. Somit kann das als ubiquitär beschriebene Vorkommen dieser Lamininkette in der Speicheldrüse nicht bestätigt wird.

Im Weiteren läßt sich ebenfalls eine eingeschränkte Expression der $\beta 2$ -Kette in den verschiedenen Basalmembranen der Speicheldrüse darstellen. Es zeigt sich eine Assoziation dieser Kette zu den dukталen Strukturen, in denen überall eine starke immunhistochemische Reaktion festgestellt wird. In den Drüsenazini erfolgt dagegen nur eine schwache Färbung der Basalmembran.

Das dargestellte Verteilungsmuster der Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ in der menschlichen Speicheldrüse deutet daraufhin, daß die Zellen in der duktoazinären Einheit je nach ihrer Differenzierung und ihrer spezifischen Funktion eine differentielle Komposition der jeweiligen Basalmembranen bezüglich der Verteilung der Lamininketten $\beta 1$ und $\beta 2$ ausbilden, so daß daraufhin auch eine unterschiedliche Verteilung der Lamininisoformen zu finden ist.

4.1.5. Die Ketten des Laminin-5 ($\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$) in der menschlichen Speicheldrüse

Das Laminin-5 wurde von Rousselle und Mitarbeitern als Bestandteil von Ankerfilamenten beschrieben, und es gilt als eines der Hauptmoleküle, die an der Verbindung zwischen den Epithelzellen und der darunter befindlichen Basalmembran beteiligt sind (Rousselle et al. 1991).

Es ist somit an der Bildung eines stabilen Verbandes beteiligt, welcher die Ablösung des Epithels vom darunter liegenden Stroma verhindert (Uitto et al. 1994; Baker et al. 1996). Aufgrund dessen wird es verstärkt in spezialisierten Epithelien gefunden, die eine spezifische Funktion besitzen, wie zum Beispiel das Plattenepithel oder das oberflächliche Drüsenepithel in der Magenschleimhaut (Aberdam et al. 1994; Uitto et al. 1994).

In der menschlichen Speicheldrüse läßt sich eine unterschiedliche Verteilung der im Laminin-5 enthaltenen Lamininketten darstellen. Die Darstellung der Ketten $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ erfolgt in der Speicheldrüse in starker Assoziation zu den Ausführungsgängen, in denen die Ketten mittels einer starken immunhistochemischen Reaktion dargestellt werden. Die immunhistochemischen Färbungen der drei Lamininketten zeigen eine ähnliche Verteilung in den übrigen Drüsenabschnitten der Speicheldrüse.

Das verstärkte Vorkommen des Laminin-5 in den Ausführungsgängen, gemessen an der stärkeren immunhistochemischen Färbung, führt nun zu dem Schluß, daß die Ausführungsgänge in der Speicheldrüse aus Epithelzellen mit anderer Differenzierung und Funktion bestehen als die Azini, die Schaltstücke und die Streifenstücke. Das vermehrte Auftreten des Laminin-5 in den Ausführungsgängen kann demnach als Anpassung des

Epithels und der Basalmembran auf eine stärkere mechanische Belastung interpretiert werden, die in diesen Gängen vorherrscht.

4.1.6. Die Lamininkette $\gamma 1$ ist Bestandteil aller epithelialen Basalmembranen der humanen Speicheldrüse

Die Lamininkette $\gamma 1$ ist in mehreren Lamininisoformen zu finden (Laminine-1-4 und -6-11) und gilt beispielsweise in den Basalmembranen der Niere als weit verbreitet (Virtanen et al. 1995a).

In der menschlichen Speicheldrüse läßt sich eine ähnliche ubiquitäre Verbreitung der $\gamma 1$ -Kette darstellen. Die immunhistochemische Färbung zeigt eine mäßige Reaktion in den Azini und den Schaltstücken sowie eine schwache Reaktion in den Streifenstücken und Ausführungsgängen. Die $\gamma 1$ -Kette ist also auch in der Speicheldrüse in allen Basalmembranen, wenn auch mit leichter Präferenz zu den Azini und den Schaltstücken, zu finden. Somit läßt sich die ubiquitäre Verteilung dieser Lamininkette auch in der Speicheldrüse bestätigen.

4.1.7. Das heterogene Auftreten der Lamininisoformen in der menschlichen Speicheldrüse

In der vorliegenden Arbeit wird die Verteilung von Basalmembransubstanzen, insbesondere der Lamininketten beziehungsweise Lamininisoformen, in den Basalmembranen der menschlichen Speicheldrüse untersucht.

Hinsichtlich dem Vorkommen des Kollagen Typ IV kann kein Unterschied zwischen den Basalmembranen der Azini und den Basalmembranen der Gangstrukturen festgestellt werden. Das Kollagen Typ IV ist als ein Hauptbestandteil der Basalmembranen in allen Strukturen gleichmäßig verteilt und führt zu einer starken immunhistochemischen Färbung. Im Gegensatz hierzu wird in der Speicheldrüse eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Lamininketten in den Basalmembranen der einzelnen Abschnitte gezeigt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse läßt sich somit in den einzelnen histologischen Strukturen innerhalb der Speicheldrüse auch eine differentielle Verteilung der Lamininisoformen darstellen. Einige Lamininisoformen treten bevorzugt in bestimmten Regionen der duktoazinären Einheit auf, während andere Isoformen in diesen Abschnitten nicht so stark vertreten sind.

Das spezifische Lamininverteilungsmuster der einzelnen Drüsenabschnitte ist in der nachfolgenden Abbildung 11 veranschaulicht.

Aufgrund der in den Drüsenazini gehäuft vorkommenden Lamininketten (siehe Tabelle 5) läßt sich ein verstärktes Auftreten der Lamininisoformen-1, -2 und -10 in diesen Abschnitten der Speicheldrüse ableiten, während die Laminine-3, -4, -6, -7 und -11 nur mäßig stark erscheinen. Das Laminin-5 ist in diesen Basalmembranen nur sehr wenig enthalten.

Die Schaltstücke, die Streifenstücke und die Ausführungsgänge besitzen ebenfalls ein charakteristisches, immer wiederkehrendes Verteilungsmuster der Lamininisoformen.

In den Basalmembranen der Schaltstücke ist ein überwiegendes Vorkommen der Lamininisoformen-7, -10 und -11 zu erkennen, während die Laminine-3, -4 und -6 mäßig stark auftreten und die Laminine-1, -2 und -5 nur schwach dargestellt werden.

Die in den Streifenstücken bevorzugt auftretenden Laminine sind wiederum, wie schon in den Basalmembranen der Schaltstücke, die Isoformen-10 und -11. Ein mäßiges Vorkommen zeigen die Laminine-3, -4, -5 und -7, gefolgt von den Lamininen-1, -2 und -6, die nur sehr schwach in Erscheinung treten.

In den Ausführungsgängen der Speicheldrüse findet sich eine weitere Besonderheit des Lamininverteilungsmusters. Durch die Abwesenheit der Lamininketten $\alpha 2$ und $\beta 1$ in den Basalmembranen dieser Drüsenabschnitte resultiert, daß die Lamininisoformen, an deren Aufbau diese beiden Ketten beteiligt sind, in den Basalmembranen der Ausführungsgänge nicht vertreten sind. Zu diesen Lamininen, die somit nicht nachgewiesen werden können, zählen die Isoformen-1, -2, -4, -6 und -10.

Es bleiben folglich nur noch vier der untersuchten Laminine übrig, die am Expressionsmuster der Lamininfamilie in den Ausführungsgängen beteiligt sind. Dies sind die Isoformen-3, -5, -7 und -11. Von besonderer Bedeutung in diesem Abschnitt scheint das Laminin-5 zu sein, dessen drei Ketten alle durch eine starke immunhistochemische Reaktion in Erscheinung treten.

Ein mäßig starkes Vorkommen zeigen die Laminine-7 und -11, wogegen das Laminin-3 nur schwach dargestellt werden kann.

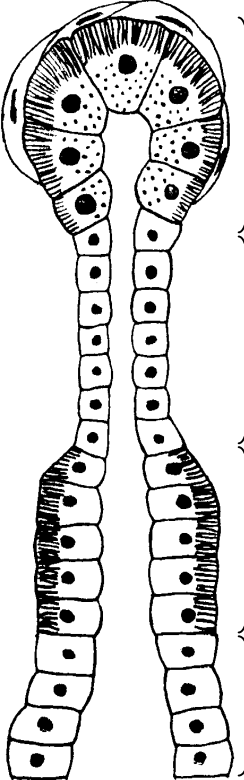
	Histologische Strukturen	Lamininisoformen	Stärke der Expression
	Drüsenazini	1, 2, 10 3, 4, 6, 7, 11 5	stark mäßig schwach
	Schaltstücke	7, 10, 11 3, 4, 6 1, 2, 5	stark mäßig schwach
	Streifenstücke	10, 11 3, 4, 5, 7 1, 2, 6	stark mäßig schwach
	Ausführungsgänge	5 7, 11 3 1, 2, 4, 6, 10	stark mäßig schwach nicht nachweisbar

Abbildung 11. Schematische Darstellung der dominierenden Lamininisoformen in den einzelnen Abschnitten der duktoazinären Einheit der adulten menschlichen Kopfspeicheldrüse

Die Lamininisoformen-8, -9 und -12 werden an dieser Stelle nicht besprochen, da die darin vorhandene Kette $\alpha 4$ (Laminine-8 und -9) sowie die $\gamma 3$ -Kette (Laminin-12) nicht basalmembranassoziiert beschrieben wurden (Vgl. Tabelle 2).

4.1.8. Zusammenfassende Betrachtung des Lamininverteilungsmusters in der Speicheldrüse

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß im Verteilungsmuster der Laminine in den Basalmembranen der Speicheldrüse mehrere Besonderheiten auffallen. Zum einen ist dies die große Diskrepanz in der Verteilung der Laminine-1 und -2, deren Expression im Verlauf vom Azinus bis zum Ausführungsgang ein deutliches Gefälle aufweist. Diese Feststellung ist vor allem auf die starke Assoziation der Lamininketten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 1$ zu den azinären Strukturen zurückzuführen, die wohl aufgrund des epithelialen Erscheinungsmusters der Azini, welches vor allem durch die Beteiligung von Myoepithelzellen geprägt ist, besondere Bedeutung erlangen. In den Gangstrukturen sind diese Lamininisoformen nicht beziehungsweise nur schwach vertreten. Das geringe Vorkommen der muskelspezifischen Moleküle ASMA und Caldesmon in diesen Abschnitten stützt diese Beobachtung, wodurch davon auszugehen ist, daß in den dukталen Drüsenanteilen nur eine sehr geringe Beteiligung von myoepithelialen Zellen besteht.

Im Weiteren kann die möglicherweise bedeutende Rolle des Laminin-5 in den Basalmembranen der Ausführungsgänge hervorgehoben werden, welches mit deutlicher Präferenz zu diesen Gangabschnitten auftritt. In den azinären Drüsenabschnitten sowie den Schaltstücken ist das Laminin-5 nur schwach und in den Streifenstücken mäßig stark vertreten. Es wird somit ein Gradient in der Laminin-5-Verteilung von den Azini bis in die Ausführungsgänge erkennbar. Aufgrund dieses Resultates kann nun die Hypothese aufgestellt werden, daß im Verlauf des Sekrettransportes, also in Richtung der Ausführungsgänge der Speicheldrüse, ein besonders starker, möglicherweise mechanischer Streß auf das Epithel ausgeübt werden muß, wie er in keinem anderen Teil der Drüse existiert. Das spezifische Epithel der Ausführungsgänge kann den mechanischen Streß nur bewältigen und seine Integrität und Funktion in diesem Drüsenabschnitt aufrechterhalten, wenn die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, insbesondere der Basalmembran, genau darauf ausgerichtet ist. Damit das Epithel in diesem Drüsenbestandteil nicht vom darunterliegenden Stroma gelöst werden kann, wird in der Basalmembran, welche das Epithel auf dem Stroma verankert, das Laminin-5 verstärkt exprimiert. Dieses ist am Aufbau der Ankerfilamente in hohem Maße beteiligt und verhindert somit die Ablösung des Epithels von der Unterlage.

Die gezeigte Verteilung der Lamininisoformen in der Speicheldrüse führt nun zu dem Schluß, daß die Epithelzellen in den einzelnen Abschnitten der duktoazinären Einheit je nach ihrer Differenzierung und ihrer spezifischen Funktion auch eine unterschiedliche Komposition ihrer Basalmembran bezüglich der Lamininisoformen bedingen, so daß in jedem Teil der Speicheldrüse ein charakteristisches, immer wiederkehrendes Verteilungsmuster der Lamininisoformen erkennbar wird.

4.2. Die Lamininisoformen im Warthin-Tumor der Speicheldrüse

In der epithelialen Basalmembran des Warthin-Tumors der menschlichen Speicheldrüse kann das Vorkommen aller mittels monoklonaler Antikörper untersuchten Lamininketten nachgewiesen werden.

Die Lamininketten lassen sich innerhalb der Basalmembran, welche durch die Färbung des Kollagen Typ IV dargestellt wird, mit unterschiedlicher Intensität veranschaulichen. Das Ausmaß der immunhistochemischen Färbung reicht von einer schwachen, punktförmigen Färbung bis zu einer starken Färbung mit einer Darstellung der Lamininketten in der gesamten Basalmembran.

Im Folgenden soll anhand des dargestellten Verteilungsmusters der Lamininketten in der Basalmembran des Warthin-Tumors ein Rückschluß auf die Existenz der verschiedenen Lamininisoformen gegeben werden.

Außerdem wird überprüft, ob anhand des Vorhandenseins bestimmter Lamininisoformen im Warthin-Tumor ein epitheliales Differenzierungsmuster identifiziert werden kann und ob eine Zuordnung dieses Differenzierungsmusters zu einer bestimmten histologischen Struktur der gesunden Speicheldrüse möglich ist.

4.2.1. Das spezifische Lamininmuster des Warthin-Tumors

Anhand des Verteilungsmusters der Lamininketten in der Basalmembran des Warthin-Tumors kann auf die Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Lamininisoformen geschlußfolgert werden.

Nachdem die Lamininketten in der Basalmembran des Warthin-Tumors in einer unterschiedlich starken Expression nachgewiesen werden können, läßt sich ableiten, daß auch die Lamininisoformen eine verschieden starke Ausprägung erfahren, so daß bevorzugt vertretende Lamininisoformen von weniger stark auftretenden Formen unterschieden werden können.

Nach dem unterschiedlichen Expressionsmuster der Lamininketten und der Kombination der einzelnen Ketten zu den Lamininisoformen läßt sich erkennen, daß in der Basalmembran des Warthin-Tumors eine Lamininisoform besonders in Erscheinung tritt. Dies ist die Lamininisoform-5, deren drei Bestandteile, die Ketten $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$, jeweils mit einer starken immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden können. Das Laminin-5 kann somit als Hauptvertreter der Lamininfamilie in der Basalmembran des Warthin-Tumors betrachtet werden.

Von den verbleibenden bekannten Lamininisoformen sind die Laminine-1, -3, -6 und -7 sowie -10 und -11 diejenigen, deren Verteilungsmuster der Lamininketten es erlauben, sie nach dem Laminin-5 als die Lamininisoformen mit der stärksten Expression in der Basalmembran des Warthin-Tumors einzuordnen.

Das schwächste Expressionsmuster aus der Lamininfamilie weisen die Lamininisoformen-2 und -4 auf, was hauptsächlich auf die geringe Verbreitung der $\alpha 2$ -Kette innerhalb der Basalmembran zurückzuführen ist.

Die beschriebene Verteilung der Lamininisoformen kann als ein spezifisches, immer wiederkehrendes Verteilungsmuster in der Basalmembran des Warthin-Tumors betrachtet werden (Vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8. Expressionsmuster der Lamininisoformen in der Basalmembran des Warthin-Tumors

<u>Lamininisoformen</u>	<u>Stärke der Expression</u>
5	stark
1, 3, 6, 7, 10, 11	mäßig
2, 4	schwach

Nur am Rande soll der Lamininnachweis in der lymphoiden Komponente des Warthin-Tumors Erwähnung finden, da in dieser Arbeit die Fokussierung auf die epitheliale Basalmembran erfolgen soll und somit die Übersichtlichkeit gewahrt wird.

Laminine sowie andere extrazelluläre Matrixmoleküle wurden schon im lymphatischen Gewebe der Milz nachgewiesen (Liakka et al. 1995). Geberhiwot und Mitarbeiter belegen, daß lymphoide Zellen vollständige Lamininmoleküle synthetisieren können und daß die Laminine-8, -10 und -11 in der Physiologie der Lymphozyten eine relevante Rolle spielen (Geberhiwot et al. 2001).

Ergebnisse von Kim und Mitarbeitern deuten auf eine bedeutende Rolle des Laminin-5 im Verlauf der T-Zell-Reifung hin (Kim et al. 2000).

Aufgrund dessen ist es nicht überraschend, daß auch im lymphoiden Stroma des Warthin-Tumors Lamininketten dargestellt werden können.

4.2.2. Theorien zur Histogenese des Warthin-Tumors

Die Frage nach der Histogenese des Warthin-Tumors wird bis heute kontrovers diskutiert. Es existieren verschiedene Theorien bezüglich der Entwicklung dieses Tumors, wobei jedoch noch keine dieser Theorien endgültig akzeptiert wurde.

Zum Einen wird nach der Heterotopie-Theorie davon ausgegangen, daß die lymphoide Komponente des Warthin-Tumors normales Lymphknotengewebe darstellt, in dem eine epitheliale Komponente proliferiert. Während der embryonalen Entwicklung werden demnach Nester von Speicheldrüsen Gewebe in intraparotischen beziehungsweise paraparotischen Lymphknoten eingeschlossen. Aus diesen Einschlüssen von

Speicheldrüsen­gewebe erfolgt nun eine neoplastische Proliferation (Allegra 1971; Diamond & Braylan 1979).

Aufbauend auf dieser Heterotopie-Theorie klassifizieren Seifert und Mitarbeiter den Warthin-Tumor nach dem Gehalt an lymphoidem Stroma. Die Entwicklung beginnt demnach mit dem Subtyp III, welcher noch reichlich lymphoides Stroma enthält. Bei weiterem Wachstum findet ein Übergang in den Subtyp I mit einem ausgeglichenen Verhältnis von Epithel und Stroma bis hin zum Subtyp II statt, in dem nun die epitheliale Tumorkomponente vorherrscht (Seifert et al. 1980).

Im Gegensatz zur Heterotopie-Theorie schlägt die Immun-Theorie vor, daß es sich beim Warthin-Tumor um eine entzündliche Reaktion lymphoider Zellen auf eine epitheliale Neoplasie handelt, welche nicht in einem Lymphknoten erfolgt. Anhand der Verteilung der Keimzentren des lymphoiden Gewebes wird angenommen, daß deren Entwicklung und Proliferation sekundär auf das Wachstum der epithelialen Komponente folgt (Chiapasco et al. 1996).

Aguirre und Mitarbeiter stellen aufgrund der Diskrepanzen zwischen den Theorien zur Histogenese des Warthin-Tumors eine neue Hypothese auf. Nach diesem Modell entwickelt sich der Warthin-Tumor als eine Reaktion auf einen bis heute nicht eindeutig identifizierten Stimulus, im Gespräch sind diesbezüglich ein Tabakkonsum oder aber eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Taira et al. 1992; Ogata et al. 1997; Gallo & Bocciolini 1997). Als Folge dieser ersten Phase des Tumorwachstums bildet sich in Assoziation zu paraparotischen Lymphknoten ein kleiner Tumor mit hauptsächlich epithelialer Komponente und nur spärlichem lymphoidem Anteil, welcher dem Subtyp II nach Seifert entspricht.

In der folgenden Phase erfolgt ein Wachstum aufgrund einer Proliferation und Infiltration einer lymphoiden Komponente als sekundäre Immunreaktion auf das epitheliale Tumorwachstum. Während dieser zweiten Phase werden die charakteristischen zystischen Formationen gebildet (entspricht Subtyp I nach Seifert).

In der dritten Phase stellt ein prominentes lymphatisches Stroma das Resultat der kontinuierlichen Infiltration der lymphatischen Komponente dar. Dieses Stadium entspricht dem Subtyp III nach Seifert (Aguirre et al. 1998).

Diese Hypothese gilt auch als Kompromiß zwischen den verschiedenen immunologischen Studien am lymphoiden Stroma des Warthin-Tumors. Demnach besteht das Stroma im frühen Stadium hauptsächlich aus T-Lymphozyten und wenig B-Lymphozyten, ähnlich

einem Lymphknoten (Diamond & Braylan 1979). Später herrschen vor allem B-Lymphozyten im Sinne einer polyklonalen B-Zell-Reaktion im Warthin-Tumor vor (Tubbs et al. 1980; Caselitz et al. 1984).

4.2.3. Ursprung der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors

Die Herkunft der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors ist ebenso noch nicht vollständig geklärt wie dessen Histogenese.

Es wird anhand einiger immunhistochemischer Studien angenommen, daß das onkozytäre Epithel im Warthin-Tumor vom Gangepithel der normalen Speicheldrüse abstammt. Dies wurde beispielsweise durch Untersuchungen von Dardick sowie Li und Mitarbeitern belegt, welche anhand des Keratinmusters im Warthin-Tumor im Vergleich zu dem der Speicheldrüse die Hypothese aufstellten, daß die Entwicklung der epithelialen Tumorkomponente aus jedem Abschnitt des Gangsystems der Speicheldrüse möglich ist (Dardick et al. 1988; Li et al. 1996).

Andere Autoren gehen von einer spezifischen Entwicklung des onkozytären Epithels aus den Streifenstücken der Speicheldrüse aus. Korsrud & Brandtzaeg behaupteten dies, nachdem sie ein ähnliches Muster der Verteilung von Immunglobulinen im Warthin-Tumor und in den Streifenstücken der Speicheldrüse nachwiesen (Korsrud & Brandtzaeg 1984). Born und Mitarbeiter nehmen ebenfalls die Streifenstücke als zellulären Ursprung des Epithels im Warthin-Tumor an (Born et al. 1987).

Im Gegensatz zu diesen Studien gehen Segami und Mitarbeiter von einer Differenzierung des zweireihigen Epithels in zwei verschiedene Zelltypen aus. Die luminale Epithelschicht entwickelt sich demnach aus den Streifenstücken, wogegen der Ursprung der basalen Zellschicht in den Ausführungsgängen gesehen wird (Segami et al. 1989).

All diese erwähnten Studien zeigen, daß es noch nicht möglich war, das onkozytische Epithel des Warthin-Tumors definitiv einem Abschnitt der Speicheldrüse zuzuordnen, aus dem es sich ursprünglich entwickelt.

Eine Tatsache wird jedoch von allen Autoren gleichermaßen angenommen. Die Proliferation der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors scheint von den dukta-

Abschnitten der Speicheldrüse auszugehen. Ein zellulärer Ursprung aus den azinären Drüsenteilen wurde bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit soll nun der Versuch unternommen werden, das epitheliale Differenzierungsmuster anhand der Verteilung der Lamininisoformen in der Basalmembran des Warthin-Tumors einem Abschnitt der duktoazinären Einheit zuzuordnen. Diesbezüglich wurden bisher noch keine Studien veröffentlicht.

4.2.4. Vergleich des Expressionsmusters der Lamininisoformen im Warthin-Tumor mit dem der gesunden Speicheldrüse

Im Folgenden soll das Lamininverteilungsmuster in der Basalmembran des Warthin-Tumors mit dem der gesunden Speicheldrüse verglichen werden und der Versuch unternommen werden, die epitheliale Komponente des Warthin-Tumors einem spezifischen Drüsenabschnitt der Speicheldrüse zuzuordnen, aus welchem möglicherweise die Proliferation des onkozytären Epithels seinen Ausgang nimmt.

Anhand des nur mäßigen Auftretens der Lamininisoform-5 in der Basalmembran der Streifenstücke und der Tatsache, daß das Laminin-5 im Warthin-Tumor bezüglich der Färbeintensität den Hauptvertreter der Lamininfamilie darstellt, muß früheren Studien widersprochen werden, welche die Streifenstücke als Ursprung des onkozytären Epithels des Warthin-Tumors ansehen. Die anderen nachgewiesenen Lamininisoformen lassen sich ebenfalls nicht eindeutig einem Abschnitt der Speicheldrüse zuordnen.

Das starke Auftreten des Laminin-5 im Warthin-Tumor kann bevorzugt den Ausführungsgängen zugeordnet werden, in denen diese Lamininisoform ebenfalls einen Hauptbestandteil bildet. Die Ausführungsgänge bilden den einzigen Teil der duktoazinären Einheit, in dem das Laminin-5 eine so dominierende Rolle spielt wie im Warthin-Tumor. Jedoch muß wegen der Abwesenheit der Lamininisoformen-1, -2, -4, -6 sowie -10 in den Ausführungsgängen davon ausgegangen werden, daß diese ebenfalls nicht als Ursprung des Warthin-Tumors in Betracht kommen. Die genannten Laminine sind ausnahmslos in der Basalmembran des Warthin-Tumors nachweisbar.

Für die Schaltstücke als Ursprung des Epithels im Warthin-Tumor spricht allein die Lamininisoform-11, deren Lamininketten ein identisches Verteilungsmuster in den

Basalmembranen aufweisen. Diese Lamininkette kommt nach neueren Erkenntnissen auch in anderen Basalmembranen nahezu ubiquitär vor. Die übrigen untersuchten Lamininisoformen passen allerdings in keiner Weise in das spezifische Lamininmuster des Warthin-Tumors, so daß auch die Schaltstücke als Ausgangspunkt der Epithelproliferation des Warthin-Tumors abgelehnt werden muß.

Die azinären Drüsenanteile der Speicheldrüse können dem epithelialen Differenzierungsmuster des Warthin-Tumors ebenfalls nicht zugeordnet werden. Es werden zwar Gemeinsamkeiten im Verteilungsmuster der Laminine-1 und -10 deutlich, die anderen Lamininisoformen zeigen jedoch eine verschiedene Komposition innerhalb der Basalmembranen der Azini und im Warthin-Tumor. Somit können die azinären Strukturen der Speicheldrüse wie die gesamten dukталen Anteile als Ursprung der Proliferation des onkozytären Epithels des Warthin-Tumors ausgeschlossen werden.

4.2.5. Zusammenfassende Definition der epithelialen Komponente des Warthin-Tumors

Bei dem Vergleich des Verteilungsmusters der Lamininisoformen im Warthin-Tumor mit dem der Speicheldrüse fällt auf, daß das Lamininmuster des Warthin-Tumors von jedem Lamininmuster der einzelnen Abschnitte innerhalb der Speicheldrüse abweicht und somit keiner Struktur der duktoazinären Einheit definitiv zugeordnet werden kann.

Als Konsequenz dieser Erkenntnis stellt sich nun die Frage, ob es sich beim Warthin-Tumor überhaupt um eine Proliferation eines spezifischen Bestandteils der Speicheldrüse handelt. In der Basalmembran des Warthin-Tumors lassen sich anhand des Lamininmusters Eigenschaften der Azini sowie der Gangabschnitte gemeinsam erkennen. Folglich läßt sich postulieren, daß die dargestellte Lamininverteilung im Warthin-Tumor ein eigenständiges, immer wiederkehrendes epitheliales Differenzierungsmuster darstellt. Diese Theorie wird durch die Tatsache bestärkt, daß es sich bei dem Epithel des Warthin-Tumors um ein zweireihiges Epithel handelt, welches in dieser Form in der gesunden Speicheldrüse nicht in Erscheinung tritt.

Das Epithel des Warthin-Tumors entwickelt sich womöglich aus einem oder mehreren Anteilen der Speicheldrüse und differenziert sich anschließend in Kombination mit

komplexen Interaktionen zwischen dem Epithel und der extrazellulären Matrix in eine spezifische Richtung (Metaplasie). Während dieser Epithelproliferation und -differenzierung erfährt die extrazelluläre Matrix, im Speziellen die Basalmembran, ebenfalls eine Anpassung an die nunmehr vorherrschenden Verhältnisse innerhalb des Tumors.

In Folge der Ausbildung von zystischen Strukturen innerhalb des Warthin-Tumors, welche in variabler Ausprägung in jedem Warthin-Tumor auftreten, läßt sich die dominierende Rolle des Laminin-5 sowie die vergleichbare Verteilung wie in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse erklären. Das Epithel des Warthin-Tumors ist möglicherweise einer ähnlichen Beanspruchung wie das Epithel der Ausführungsgänge ausgesetzt. Um die Funktion und Integrität des Epithels zu gewährleisten, wird durch komplexe Zell-Matrix-Interaktionen vermehrt Laminin-5 exprimiert, welches am Aufbau der Ankerfilamente beteiligt ist und somit zu einer erhöhten Stabilität in der Verbindung zwischen Epithel und Stroma beiträgt.

4.3. Die Lamininkettenverteilung im pleomorphen Adenom

4.3.1. Die Lamininkettenpolymorphie der basalzelligen und spindelzelligen Komponenten im Pleomorphen Adenom

Aufgrund der dargestellten Lamininkettenverteilung kann festgehalten werden, daß im pleomorphen Adenom alle Lamininketten in unterschiedlicher Qualität und Quantität vorkommen können. Das pleomorphe Adenom ist also als Tumor anzusehen, dessen Vielgestaltigkeit nicht nur im histopathologischen Erscheinungsbild, sondern ebenfalls im immunhistochemischen Nachweis der Lamininketten zum Ausdruck kommt. Prinzipiell läßt der Nachweis aller untersuchten Lamininketten auf die mögliche Bildung aller Lamininisformen rückschließen.

Eine Zuordnung eines spezifischen Verteilungsmusters der Lamininketten zu den verschiedenen zellulären Differenzierungen ist infolge des unspezifischen Nachweises aller untersuchten Lamininketten nicht möglich. Weiterführend ist somit auch keine Aussage

über die Zuordnung des pleomorphen Adenoms bezüglich der Abstammung aus einem singulären Abschnitt der duktoazinären Einheit der Speicheldrüse möglich. Die Assoziation zu verschiedensten Lamininketten gilt nicht nur für das pleomorphe Adenom als Gesamttumor, sondern auch für die Zellen mit Basalzellphänotyp innerhalb des pleomorphen Adenoms.

Es kann somit postuliert werden, daß die Basalzellen im pleomorphen Adenom keine uniforme Zellpopulation darstellen, sondern daß es sich bei diesem Zelltyp um pluripotente Zellen handelt, welche eine gewisse Differenzierungspotenz besitzen und auch eine Art Stammzellfunktion aufweisen.

Die solid-spindelzellige Zelldifferenzierung, welche ebenfalls wie die Basalzellen alle Lamininketten exprimieren kann, läßt sich möglicherweise auch dem pluripotenten Zelltyp im pleomorphen Adenom zuordnen, welcher die verschiedenen Lamininketten in ungeordneter Art und Weise exprimiert.

4.3.2. Der formale Gewebsbildungsprozeß des pleomorphen Adenoms in Bezug auf die Lamininkettenverteilung

Das immunhistochemische Lamininkettenmuster im pleomorphen Adenom, welches sich von spotförmigen Depositionen über BM-artige Segmente bis hin zu vollständigen Basalmembranstrukturen erstreckt, läßt Rückschlüsse auf den möglichen formalen Gewebsbildungsprozeß zu.

Der dargestellte pluripotente Zelltyp in Form einer Stammzellpopulation bildet zunächst unregelmäßig spotförmig nachweisbare Basalmembransubstanzen, wobei diese teilweise auch intrazellulär vorgefunden werden können. Es folgt eine Expansion der sich bildenden differenzierenden Zellhaufen, welche weiterhin Basalmembransubstanzen, insbesondere Laminin und Kollagen Typ IV produzieren, die dann teilweise in Form komplexer Basalmembranen erscheinen.

Im Inneren dieser Stammzellhaufen werden über eine Art Selbstrekrutierung der pluripotenten beziehungsweise Stammzellen immer wieder von Neuem Kondensationskeime gebildet, die wiederum den dargestellten Zyklus durchlaufen. Die sich immer und immer wieder bildenden Kondensationskeime stellen den Versuch des

Tumors dar, duktoazinäre Einheiten zu produzieren. Es erfolgt jedoch eine Fehldifferenzierung dieser Keime und wiederum eine Selbstrekutierung und Proliferation der pluripotenten Zellpopulation, so daß vom Inneren dieser bläschenartigen Proliferationen ein stetiger Nachschub an dedifferenzierten duktoazinären Einheiten gewährleistet ist und infolgedessen auch weiterhin Basalmembranmaterial produziert wird. Das produzierte Basalmembranmaterial erfährt in den äußeren Abschnitten eine zunehmende Ordnung in Form echter Basalmembranen.

Interessanterweise ist nach Aigner und Mitarbeitern eine epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung möglich, welche durch eine Transdifferenzierung von tubulär über myxoid bis hin zu chondroid differenzierten Abschnitten pleomorpher Adenome gezeigt wurde und das Hauptprinzip der Heterogenität des pleomorphen Adenoms darstellen soll (Aigner et al. 1998).

4.3.3. Erhalt der Ko-Expression von Laminin und Kollagen Typ IV auch im pleomorphen Adenom

Das pleomorphe Adenom ist gekennzeichnet durch die starke Variationsbreite im Nachweis der Lamininketten, welche alle ohne Ausnahme im pleomorphen Adenom nachgewiesen werden können. Im Weiteren erfolgt der Nachweis von Kollagen Typ IV ebenfalls in allen pleomorphen Adenomen in einem ähnlichen Depositionsmuster wie es die Lamininketten zeigen. Es wird somit die Ko-Lokalisation der beiden Basalmembranbestandteile auch in Tumoren erhalten.

Aufgrund dieser Erkenntnisse müssen die Untersuchungen von Soini & Autio sowie Félix und Mitarbeitern widerlegt werden, welche eine Laminin-Deposition ohne den Nachweis von Kollagen Typ IV, also einen Verlust der Ko-Expression von Laminin und Kollagen Typ IV im pleomorphen Adenom beschreiben (Soini & Autio 1993; Félix et al. 1999).

Diese Beobachtung läßt sich begründen, indem es sich hier womöglich um unreife Basalmembran-Vorläufer handelt, welche in ihrer Entwicklung vor dem Kollagen Typ IV zunächst Vertreter der Lamininfamilie exprimieren. Diese Möglichkeit wurde schon von Larjava und Mitarbeitern beschrieben (Larjava et al. 1996).

In dieser Arbeit erfolgt, im Gegensatz zu den Untersuchungen der genannten Arbeitsgruppen, erstmalig die Darstellung des Verteilungsmusters der einzelnen Lamininketten mittels spezifischer monoklonaler Antikörper.

Es kann im Gegenteil ein vermehrtes Vorkommen differenter Lamininketten im pleomorphen Adenom im Gegensatz zur gesunden Speicheldrüse gezeigt werden, was auf die Anwesenheit von pluripotenten Stammzellpopulationen zurückgeführt werden kann, welche unspezifisch alle Lamininketten in einem unterschiedlichen Depositionsmuster, abhängig vom jeweiligen zellulären Erscheinungsbild, exprimieren.

Weiterhin kann jedoch eine obligate Ko-Lokalisation von Kollagen Typ IV und allen untersuchten Lamininketten ausgeschlossen werden, da beispielsweise im spindelzelligen Kompartiment des pleomorphen Adenoms Kollagen Typ IV in Abwesenheit der Lamininketten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ exprimiert wird.

Es ist somit nicht ausgeschlossen, daß aufgrund der verschiedenen Reifegrade im pleomorphen Adenom, wie sie in 4.3.1. und 4.3.2. anhand des zellulären Erscheinungsbildes und der Basalmembranen geschildert wurden, die Laminine nicht immer in Verbindung mit dem Kollagen Typ IV exprimiert werden.

4.3.4. Vergleich des Lamininverteilungsmusters im pleomorphen Adenom mit dem der gesunden Speicheldrüse

Bei der Betrachtung des Verteilungsmusters der Lamininketten im pleomorphen Adenom fällt auf, daß alle untersuchten Lamininketten nachweisbar sind. Aufgrund der Vielzahl der an dessen Aufbau beteiligten Zelltypen, etwa basalzellig-myoepithelialer oder epithelialer Art, ist der Befund nicht überraschend.

Den verschiedenen Zelltypen lassen sich keine eindeutigen Lamininmuster zuordnen.

In Folge dessen läßt sich aus dem Lamininverteilungsmuster im pleomorphen Adenom auch kein Rückschluß auf einen möglichen Ursprung aus einem singulären Anteil der gesunden Speicheldrüse ziehen.

4.4. Laminine sind nicht obligat an epitheliale Basalmembranen gebunden

Außerhalb der epithelialen Basalmembranen als komplexem Anteil der extrazellulären Matrix können Vertreter der Lamininfamilie ebenfalls in den Basallaminae mesenchymaler Gewebe nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den epithelialen Basalmembranen sind hier jedoch andere Lamininisoformen vertreten.

Ähnlich wie von Pyke und Mitarbeitern um mesenchymale Tumorzellen in Sarkomen beschrieben fehlt auch im myxoiden pleomorphen Adenom der Speicheldrüse die Lamininkette $\gamma 2$, woraus geschlußfolgert werden kann, daß das Laminin-5 in mesenchymalen Geweben im Vergleich zu epithelialen Basalmembranen eine eher untergeordnete Rolle spielt. Im Weiteren sind auch die $\alpha 3$ - sowie die $\beta 3$ -Kette als Bestandteil des Laminin-5 im myxoiden pleomorphen Adenom nicht vertreten (Pyke et al. 1994).

In mesenchymalen Geweben wird beispielsweise um Nervenzellen die $\alpha 2$ -Kette als bedeutsamer Bestandteil der extrazellulären Matrix beschrieben (Hagg et al. 1997). Im myxoiden pleomorphen Adenom erfolgt in Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen ebenfalls der Nachweis der $\alpha 2$ -Kette.

Bezüglich der Lamininkette $\beta 2$ erfolgt eine differenzierte Expression. In Ovarialkarzinomen wird ein Vorkommen dieser Kette beschrieben, während sie in Kolonkarzinomen nicht nachweisbar ist (Wewer et al. 1994a).

In den Untersuchungen von Aigner und Mitarbeitern, welche im pleomorphen Adenom eine epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung anhand charakteristischer Glykosaminoglykane belegten, konnte in myxoid sowie chondroid differenzierten Abschnitten von pleomorphen Adenomen kein Laminin und Kollagen Typ IV nachgewiesen werden (Aigner et al. 1998).

In dieser Arbeit kann nun erstmals durch den Nachweis spezifischer Lamininketten gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu den genannten Untersuchungen, auch im myxoiden Stromabestandteil des pleomorphen Adenoms zumindest eine spotförmige Laminindeposition erfolgt. Im Speziellen sind dies die Lamininketten $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ sowie $\gamma 1$. Das Verteilungsmuster des Kollagen Typ IV verhält sich analog dem der Laminine. Es können somit keine strukturierten Basalmembrananteile nachgewiesen werden.

Bei den chondroid differenzierten Tumoranteilen kann weiterhin postuliert werden, daß auch hier die Laminine in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Lee und Mitarbeitern eine bedeutende Rolle als Bestandteil der extrazellulären Matrix spielen. Sie gehen bei der Chondrogenese durch einen signifikanten Nachweis von Laminen davon aus, daß diese hierbei eine essentielle Bedeutung besitzen (Lee et al. 1997).

4.5. Diskontinuierliche Lamininmuster der Basalmembranen sind kein karzinomspezifisches Phänomen

Irregularitäten von Basalmembranen bezüglich ihres Lamingehaltes, welche beispielsweise im oralen Plattenepithelkarzinom oder im Prostatakarzinom anhand von Laminin-5 beschrieben werden, können nicht als karzinomspezifische Phänomene gewertet werden (Hao et al. 1996; Haas et al. 2001).

Auch in gesunden humanen Speicheldrüsen können, sobald die Verteilung der verschiedenen Lamininketten des Laminin-5 betrachtet wird, Basalmembranabbrüche verzeichnet werden, welche nicht als pathologisch zu werten sind.

Ebenso können Irregularitäten von Basalmembranen oder sogar der Verlust von Ketten des Laminin-5, wie sie im pleomorphen Adenom dargestellt werden, nicht als Indikator einer malignen Entartung betrachtet werden.

4.6. Die diagnostische Wertigkeit von Lamininverteilungsmustern

Bestimmte Verteilungsmuster von Lamininketten können in der Diagnostik von Tumoren nur genutzt werden, wenn es für einen speziellen Tumor einen spezifischen Marker beziehungsweise ein spezifisches Lamininmuster gibt, welche den Tumor mittels immunhistochemischer Untersuchungen eindeutig identifizieren können.

Aufgrund der Buntheit des Lamininverteilungsmusters im pleomorphen Adenom läßt sich diese diagnostische Methode für die Diagnostik dieses Tumors nicht übertragen. Insofern darf lediglich die Diversität des Lamininmusters als charakteristisch gelten. Es existiert

keine Lamininkette bzw. -isoform, die das pleomorphe Adenom eindeutig identifizieren kann.

Das pleomorphe Adenom ist durch das Auftreten aller bisher bekannten Lamininketten und folglich aller Lamininisoformen gekennzeichnet.

4.7. Der Laminin- und Kollagen Typ IV-Gehalt im pleomorphen Adenom als Malignitätsmarker

Der vermehrte Gehalt an Laminin und Kollagen Typ IV in maligne entarteten pleomorphen Adenomen im Vergleich zum pleomorphen Adenom stellt nach Untersuchungen von Felix und Mitarbeitern einen Marker für Malignität beziehungsweise das Metastasierungsverhalten von maligne entarteten pleomorphen Adenomen dar (Félix et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit können jedoch in den untersuchten pleomorphen Adenomen die genannten extrazellulären Matrixmoleküle ebenfalls zum Teil sogar in Form echter Basalmembranen nachgewiesen werden, wobei histologisch und durch den klinischen Verlauf eine Malignität definitiv ausgeschlossen werden konnte.

Es muß somit darauf hingewiesen werden, daß die Verteilungsmuster der Laminine sowie des Kollagen Typ IV nur ein gewisser Anhaltspunkt bezüglich der Diagnose maligner oder benigner pleomorpher Adenome sein können und daß folglich andere diagnostische Marker zumindest zusätzlich notwendig erscheinen.

Nach den eigenen Beobachtungen stellen auch diskontinuierliche Kollagen Typ IV-Muster der Basalmembranen im pleomorphen Adenom keinen Malignitätsmarker dar. Sie werden als Ausdruck einer wechselnden Differenzierungshöhe beziehungsweise des Reifegrades der jeweiligen Strukturen im pleomorphen Adenom angesehen.

5. Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix stellt in Form der epithelialen Basalmembranen eine Struktur dar, die über äußerst komplexe Zell-Matrix-Interaktionen an Prozessen wie der Zelldifferenzierung beziehungsweise der Zellreifung oder der Aufrechterhaltung der Gewebsarchitektur in hohem Maße beteiligt ist.

Die Molekülfamilie der Laminine, welche maßgeblich am Aufbau der epithelialen Basalmembranen beteiligt sind, zeigen einen heterotrimeren Aufbau und bilden über verschiedene Kettenkombinationen die Lamininisoformen.

In dieser Arbeit soll nun durch Nachweis der einzelnen Lamininketten in den epithelialen Basalmembranen der humanen Kopfspeicheldrüse mittels monoklonaler Antikörper ein Rückschluß auf die Verteilung der Lamininisoformen erbracht werden. Ziel ist es, in differenten Strukturen der Speicheldrüse unterschiedliche Lamininmuster zu definieren.

Weiterhin wird untersucht, ob im Warthin-Tumor sowie im pleomorphen Adenom der Speicheldrüse anhand der Lamininexpression epitheliale Differenzierungsmuster identifiziert werden können, die einen Hinweis bezüglich der Histogenese dieser Tumoren geben können. Außerdem wird das pleomorphe Adenom in Hinblick auf spezialisierte zelluläre Differenzierungen sowie mögliche Kompartimentierungen untersucht.

Anhand des Nachweises der Lamininketten in der Speicheldrüse kann eine dem derzeitigen Kenntnisstand entsprechende Verteilung der Lamininisoformen dargestellt werden, welche die gestellte Hypothese bestätigt, wonach die azinären und duktaalen Bestandteile der Speicheldrüse ein ihrer Differenzierung und Funktion entsprechendes, charakteristisches Lamininverteilungsmuster aufweisen.

In den epithelialen Basalmembranen des Warthin-Tumors läßt sich ebenfalls ein spezifisches, immer wiederkehrendes Lamininmuster definieren, anhand dessen jedoch nicht definitiv auf einen zellulären Ursprung aus der Speicheldrüse rückgeschlossen werden kann. Vielmehr läßt sich das Lamininmuster des Warthin-Tumors vor allem aufgrund des starken Laminin-5-Gehaltes als reaktiv betrachten, wobei das Laminin-5 durch ähnliche mechanische Beanspruchungen wie sie in den Ausführungsgängen der Speicheldrüse herrschen, vermehrt exprimiert wird.

Die Vielgestaltigkeit des pleomorphen Adenom wird ebenfalls bei Betrachtung der Lamininverteilung deutlich. Aufgrund des Nachweises aller untersuchten Lamininketten

läßt sich kein spezifisches Verteilungsmuster beschreiben beziehungsweise ein zellulärer Ursprung benennen. Es läßt sich hingegen postulieren, daß den verschiedenen Zelltypen im pleomorphen Adenom eine Stammzellfunktion zugeschrieben werden kann, wobei diese Zellen fehlendifferenzierte duktoazinäre Einheiten bilden, die undifferenziert Basalmembranmaterial produzieren, das zunächst ungeordnet und später basalmembranartig abgelagert wird.

Das Vorkommen der Molekülfamilie der Laminine ist somit nicht obligat an epitheliale Basalmembranen gebunden, sondern die Laminine können auch diffus verteilt im Stromaanteil nachgewiesen werden.

Die Diversität der Laminin- und Kollagen Typ IV-Deposition entspricht einer unterschiedlichen Differenzierung und einer wechselnden Gewebsreife innerhalb des pleomorphen Adenoms und stellt nach eigenen Befunden kein Malignitätskriterium dar.

Im Weiteren können diskontinuierliche Basalmembranmuster bezüglich der Verteilung der Lamininketten dargestellt werden, welche nicht, wie im oralen Plattenepithelkarzinom nachgewiesen, als karzinomspezifische Phänomene zu werten sind.

Literaturverzeichnis

1. ABERDAM, D.; AGUZZI, A.; BAUDOUIN, C.; GALLIANO, M. F.; ORTONNE, J. P.; MENEGUZZI, G.: Developmental expression of nicein adhesion protein (laminin-5) subunits suggests multiple morphogenic roles. *Cell Adhes.Commun.* 2 (1994), 115-129
2. ADAMS, J. C.; WATT, F. M.: Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117 (1993), 1183-1198
3. AGUIRRE, J. M.; ECHEBARRIA, M. A.; MARTINEZ, C. R.; RODRIGUEZ, C.; BURGOS, J. J.; RIVERA, J. M.: Warthin tumor. A new hypothesis concerning its development. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 85 (1998), 60-63
4. AIGNER, T.; NEUREITER, D.; VOLKER, U.; BELKE, J.; KIRCHNER, T.: Epithelial-mesenchymal transdifferentiation and extracellular matrix gene expression in pleomorphic adenomas of the parotid salivary gland. *J.Pathol.* 186 (1998), 178-185
5. ALLEGRA, S.: Warthin's tumor: a hypersensitivity disease? Ultrastructural, light, and immunofluorescent study. *Hum Pathol* 2 (1971), 403-20
6. BAKER, S. E.; HOPKINSON, S. B.; FITCHMUN, M.; ANDREASON, G. L.; FRASIER, F.; PLOPPER, G.; QUARANTA, V.; JONES, J. C.: Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J.Cell Sci.* 109 (1996), 2509-2520
7. BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J.: Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4 (1990), 148-160
8. BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G.: How does the extracellular matrix direct gene expression? *J.Theor.Biol.* 99 (1982), 31-68
9. BISSELL, M. J.; RAM, T. G.: Regulation of functional cytodifferentiation and histogenesis in mammary epithelial cells: role of the extracellular matrix. *Environ.Health Perspect.* 80 (1989), 61-70
10. BORN, I.; SCHWECHHEIMER, K.; MAIER, H.; OTTO, H.: Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 411 (1987), 583-9

-
11. BOSMAN, F. T.; CLEUTJENS, J.; BEEK, C.; HAVENITH, M.: Basement membrane heterogeneity. *Histochem.J.* 21 (1989), 629-633
 12. BÖTTCHER, K.: Lamininisoformen und Integrinketten im Tubulussystem der humanen adulten Niere. *Medizinische Dissertation FSU Jena* (1999),
 13. BURGESSON, R. E.; CHIQUET, M.; DEUTZMANN, R.; EKBLOM, P.; ENGEL, J.; KLEINMAN, H.; MARTIN, G. R.; MENEGUZZI, G.; PAULSSON, M.; SANES, J.; ET, A.: A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* 14 (1994), 209-211
 14. CARTER, W. G.; RYAN, M. C.; GAHR, P. J. (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for the integrin $\alpha 3\beta 1$ in epithelial basement membranes. *Cell*, pp. 599-610.
 15. CASELITZ, J.; SALFELDER, A.; SEIFERT, G.: Adenolymphoma: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies against lymphocyte antigens. *J Oral Pathol* 13 (1984), 438-47
 16. CASELITZ, J.; SCHMITT, P.; SEIFERT, G.; WUSTROW, J.; SCHUPPAN, D.: Basal membrane associated substances in human salivary glands and salivary gland tumours. *Pathol.Res.Pract.* 183 (1988), 386-394
 17. CATUSSE, C.; POLETTE, M.; CORAUX, C.; BURLET, H.; BIREMBAUT, P.: Modified basement membrane composition during bronchopulmonary tumor progression. *J.Histochem.Cytochem.* 48 (2000), 663-669
 18. CHAMPLIAUD, M. F.; LUNSTRUM, G. P.; ROUSSELLE, P.; NISHIYAMA, T.; KEENE, D. R.; BURGESSON, R. E.: Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J.Cell Biol.* 132 (1996), 1189-1198
 19. CHAN, F. L.; INOUE, S.; LEBLOND, C. P.: The basement membranes of cryofixed or aldehyde-fixed, freeze-substituted tissues are composed of a lamina densa and do not contain a lamina lucida. *Cell Tissue Res.* 273 (1993), 41-52
 20. CHENG, Y. S.; CHAMPLIAUD, M. F.; BURGESSON, R. E.; MARINKOVICH, M. P.; YURCHENCO, P. D.: Self-assembly of laminin isoforms. *J.Biol.Chem.* 272 (1997), 31525-31532
 21. CHIAPASCO, M.; RONCHI, P.; SCOLA, G.: [Warthin tumor of the palate: an unusual location]. *Minerva Stomatol* 45 (1996), 605-10
 22. CHURCH, H. J.; APLIN, J. D.: BeWo choriocarcinoma cells produce laminin 10. *Biochem.J.* 332 (1998), 491-498
-

-
23. COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D.: Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev.Dyn.* 218 (2000), 213-234
 24. COLOGNATO, P. H.; O'REAR, J. J.; YAMADA, Y.; CARBONETTO, S.; CHENG, Y. S.; YURCHENCO, P. D.: Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. *J.Biol.Chem.* 270 (1995), 9398-9406
 25. DARDICK, I.; CLAUDE, A.; PARKS, W.; HOPPE, D.; STINSON, J.; BURNS, B.; LITTLE, J.; BROWN, D.; DAIRKEE, S.: Warthin's tumor: an ultrastructural and immunohistochemical study of basilar epithelium. *Ultrastruct Pathol* 12 (1988), 419-32
 26. DEAN, J. W.; CHANDRASEKARAN, S.; TANZER, M. L.: A biological role of the carbohydrate moieties of laminin. *J.Biol.Chem.* 265 (1990), 12553-12562
 27. DIAMOND, L.; BRAYLAN, R.: Cell surface markers on lymphoid cells from Warthin's tumors. *Cancer* 44 (1979), 580-3
 28. DINGES, H.; ZATLOUKAL, K.; SCHMID, C.; MAIR, S.; WIRNSBERGER, G.: Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in rete testis and epididymis. An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418 (1991), 119-27
 29. DOLIANA, R.; BONALDO, P.; COLOMBATTI, A.: Multiple forms of chicken alpha 3(VI) collagen chain generated by alternative splicing in type A repeated domains. *J.Cell Biol.* 111 (1990), 2197-2205
 30. DURBEEJ, M.; FECKER, L.; HJALT, T.; ZHANG, H. Y.; SALMIVIRTA, K.; KLEIN, G.; TIMPL, R.; SOROKIN, L.; EBENDAL, T.; EKBLOM, P.; EKBLOM, M.: Expression of laminin alpha 1, alpha 5 and beta 2 chains during embryogenesis of the kidney and vasculature. *Matrix Biol.* 15 (1996), 397-413
 31. DZIADEK, M.; TIMPL, R.: Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev.Biol.* 111 (1985), 372-382
 32. EHRIG, K.; LEIVO, I.; ARGRAVES, W. S.; RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.: Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (1990), 3264-3268

-
33. ENGEL, J. (1993) Structure and function of laminin. In: Rohrbach DH, Timpl R (eds) Molecular and cellular aspects of basement membranes. *Academic Press, San Diego*, pp. 147-176.
 34. ENGVALL, E.; DAVIS, G. E.; DICKERSON, K.; RUOSLAHTI, E.; VARON, S.; MANTHORPE, M.: Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localization of the neurite-promoting site. *J.Cell Biol.* 103 (1986), 2457-2465
 35. ENGVALL, E.; EARWICKER, D.; HAAPARANTA, T.; RUOSLAHTI, E.; SANES, J. R.: Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul.* 1 (1990), 731-740
 36. ENGVALL, E.; WEWER, U. M.: Domains of laminin. *J.Cell Biochem.* 61 (1996), 493-501
 37. FÉLIX, A.; ROSA, J. C.; FONSECA, I.; CIDADÃO, A.; SOARES, J.: Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. *Hum.Pathol.* 30 (1999), 964-969
 38. FOIDART, J. M.; BERE-EW, J.; YAAR, M.; RENNARD, S. I.; GULLINO, M.; MARTIN, G. R.; KATZ, S. I.: Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest* 42 (1980), 336-342
 39. GALLIANO, M. F.; ABERDAM, D.; AGUZZI, A.; ORTONNE, J. P.; MENEGUZZI, G.: Cloning and complete primary structure of the mouse laminin alpha 3 chain. Distinct expression pattern of the laminin alpha 3A and alpha 3B chain isoforms. *J.Biol.Chem.* 270 (1995), 21820-21826
 40. GALLO, O.; BOCCIOLINI, C.: Warthin's tumour associated with autoimmune diseases and tobacco use. *Acta Otolaryngol* 117 (1997), 623-7
 41. GEBERHIWOT, T.; ASSEFA, D.; KORTESMAA, J.; INGERPUU, S.; PEDRAZA, C.; WONDIMU, Z.; CHARO, J.; KIESSLING, R.; VIRTANEN, I.; TRYGGVASON, K.; PATARROYO, M.: Laminin-8 (alpha4beta1gamma1) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation. *J Cell Sci* 114 (2001), 423-33
 42. GUSTMANN, C.; ALTMANNBERGER, M.; OSBORN, M.; GRIESSER, H.; FELLER, A. C.: Cytokeratin expression and vimentin content in large cell anaplastic lymphomas and other non-Hodgkin's lymphomas. *Am.J.Pathol.* 138 (1991), 1413-1422

-
43. HAAS, K.; BERNDT, A.; STILLER, K.; HYCKEL, P.; KOSMEHL, H.: A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. *J Histochem Cytochem* 49 (2001), 1261-8
 44. HAGG, T.; PORTERA-CAILLIAU, C.; JUCKER, M.; ENGVALL, E.: Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res* 764 (1997), 17-27
 45. HAO, J.; YANG, Y.; MCDANIEL, K.; DALKIN, B.; CRESS, A.; NAGLE, R.: Differential expression of laminin 5 (alpha 3 beta 3 gamma 2) by human malignant and normal prostate. *Am J Pathol* 149 (1996), 1341-9
 46. HARADA, T.; SHINOHARA, M.; NAKAMURA, S.; OKA, M.: An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Arch.* 424 (1994), 257-266
 47. HENNING, K.; KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; ROUSSELLE, P.; GABLER, U.; KATENKAMP, D.: Differential expression of laminin chains in benign and malignant lesions of the breast. *Pathol Res Pract* 191 (1995), 175
 48. HINDERMAN, W.; BERNDT, A.; BORSI, L.; LUO, X.; HYCKEL, P.; KATENKAMP, D.; KOSMEHL, H.: Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin-C isoform in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189 (1999), 475-80
 49. HUNTER, D. D.; SHAH, V.; MERLIE, J. P.; SANES, J. R.: A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* 338 (1989), 229-234
 50. IIVANAINEN, A.; SAINIO, K.; SARIOLA, H.; TRYGGVASON, K.: Primary structure and expression of a novel human laminin alpha 4 chain. *FEBS Lett.* 365 (1995a), 183-188
 51. IIVANAINEN, A.; VUOLTEENAHU, R.; SAINIO, K.; EDDY, R.; SHOWS, T. B.; SARIOLA, H.; TRYGGVASON, K.: The human laminin beta 2 chain (S-laminin): structure, expression in fetal tissues and chromosomal assignment of the LAMB2 gene. *Matrix Biol.* 14 (1995b), 489-497
 52. INOUE, S.: Basic structure of basement membranes is a fine network of "cords," irregular anastomosing strands. *Microsc.Res.Tech.* 28 (1994), 29-47
 53. KALLUNKI, P.; SAINIO, K.; EDDY, R.; BYERS, M.; KALLUNKI, T.; SARIOLA, H.; BECK, K.; HIRVONEN, H.; SHOWS, T. B.; TRYGGVASON, K.: A truncated laminin

-
- chain homologous to the B2 chain: structure, spatial expression, and chromosomal assignment. *J.Cell Biol.* 119 (1992), 679-693
54. KIM, M. G.; LEE, G.; LEE, S. K.; LOLKEMA, M.; YIM, J.; HONG, S. H.; SCHWARTZ, R. H.: Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. *J.Immunol.* 165 (2000), 192-201
55. KIRKHAM, N.; PRICE, M. L.; GIBSON, B.; LEIGH, I. M.; COBURN, P.; DARLEY, C. R.: Type VII collagen antibody LH 7.2 identifies basement membrane characteristics of thin malignant melanomas. *J.Pathol.* 157 (1989), 243-247
56. KOCH, M.; OLSON, P. F.; ALBUS, A.; JIN, W.; HUNTER, D. D.; BRUNKEN, W. J.; BURGESSON, R. E.; CHAMPLAUD, M. F.: Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J.Cell Biol.* 145 (1999), 605-618
57. KORGE, B. P.; KRIEG, T.: The molecular basis for inherited bullous diseases. *J.Mol.Med.* 74 (1996), 59-70
58. KORSRUD, F.; BRANDTZAEG, P.: Immunohistochemical characterization of cellular immunoglobulins and epithelial marker antigens in Warthin's tumor. *Hum Pathol* 15 (1984), 361-7
59. KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; KATENKAMP, D.: Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch.* 429 (1996), 311-322
60. KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; KATENKAMP, D.; MANDEL, U.; BOHLE, R.; GABLER, U.; CELEDA, D.: Differential expression of fibronectin splice variants, oncofetal glycosylated fibronectin and laminin isoforms in nodular palmar fibromatosis. *Pathol.Res.Pract.* 191 (1995), 1105-1113
61. LANGUINO, L. R.; GEHLEN, K. R.; WAYNER, E.; CARTER, W. G.; ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E.: Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J.Cell Biol.* 109 (1989), 2455-2462
62. LARJAVA, H.; HAAPASALMI, K.; SALO, T.; WIEBE, C.; UITTO, V.: Keratinocyte integrins in wound healing and chronic inflammation of the human periodontium. *Oral Dis* 2 (1996), 77-86
63. LAURIE, G. W.; LEBLOND, C. P.; INOUE, S.; MARTIN, G. R.; CHUNG, A.: Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalization of five basement membrane components to the lamina densa (basal lamina) and its
-

-
- extensions in both glomeruli and tubules of the rat kidney. *Am.J.Anat.* 169 (1984), 463-481
64. LEE, S.; MALPELI, M.; CANCEDDA, R.; UTANI, A.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H.: Laminin chain expression by chick chondrocytes and mouse cartilaginous tissues in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 236 (1997), 212-22
65. LEFEBVRE, O.; SOROKIN, L.; KEDINGER, M.; SIMON, A. P.: Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. *Dev.Biol.* 210 (1999), 135-150
66. LEIVO, I.; ENGVALL, E.: Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 (1988), 1544-1548
67. LEIVO, I.; ENGVALL, E.; LAURILA, P.; MIETTINEN, M.: Distribution of merosin, a laminin-related tissue-specific basement membrane protein, in human Schwann cell neoplasms. *Lab Invest* 61 (1989), 426-432
68. LI, C.; OKAMOTO, Y.; OHMURA, H.; OGAWA, K.; SHRESTHA, P.; MORI, M.: Expression of cytokeratins in Warthin's tumour (adenolymphoma) of parotid glands: specific detection of individual cytokeratin types by monoclonal antibodies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B (1996), 352-8
69. LIAKKA, A.; KARJALAINEN, H.; VIRTANEN, I.; AUTIO, H. H.: Immuno-electron-microscopic localization of types III pN-collagen and IV collagen, laminin and tenascin in developing and adult human spleen. *Cell Tissue Res.* 282 (1995), 117-127
70. LIN, J.; LIN, J.; DAVIS-NANTHAKUMAR, E.; LOURIM, D.: Monoclonal antibodies against caldesmon, a Ca⁺⁺/calmodulin- and actin-binding protein of smooth muscle and nonmuscle cells. *Hybridoma* 7 (1988), 273-88
71. LOHI, J.; LEIVO, I.; OWARIBE, K.; BURGESSON, R. E.; FRANSSILA, K.; VIRTANEN, I.: Neoexpression of the epithelial adhesion complex antigens in thyroid tumours is associated with proliferation and squamous differentiation markers. *J.Pathol.* 184 (1998), 191-196
72. MALANDRINI, A.; VILLANOVA, M.; SABATELLI, P.; SQUARZONI, S.; SIX, J.; TOTI, P.; GUAZZI, G.; MARALDI, N. M.: Localization of the laminin alpha 2 chain in normal human skeletal muscle and peripheral nerve: an ultrastructural immunolabeling study. *Acta Neuropathol.Berl* 93 (1997), 166-172
-

-
73. MARCHISIO, P. C.; CREMONA, O.; SAVOIA, P.; PELLEGRINI, G.; ORTONNE, J. P.; VERRANDO, P.; BURGESSON, R. E.; CANCEDDA, R.; DE LUCA, M.: The basement membrane protein BM-600/nicein codistributes with kalinin and the integrin alpha 6 beta 4 in human cultured keratinocytes. *Exp.Cell Res.* 205 (1993), 205-212
74. MARINKOVICH, M. P.; LUNSTRUM, G. P.; KEENE, D. R.; BURGESSON, R. E.: The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J.Cell Biol.* 119 (1992), 695-703
75. MARINKOVICH, M. P.; VERRANDO, P.; KEENE, D. R.; MENEGUZZI, G.; LUNSTRUM, G. P.; ORTONNE, J. P.; BURGESSON, R. E.: Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical. *Lab Invest* 69 (1993), 295-299
76. MARTIN, G. R.; TIMPL, R.: Laminin and other basement membrane components. *Annu.Rev.Cell Biol.* 3 (1987), 57-85
77. MARTIN, P. T.; ETTINGER, A. J.; SANES, J. R.: A synaptic localization domain in the synaptic cleft protein laminin beta 2 (s-laminin) [see comments]. *Science* 269 (1995), 413-416
78. MARTINEZ, H. A.; AMENTA, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48 (1983), 656-677
79. MATSUI, C.; NELSON, C. F.; HERNANDEZ, G. T.; HERRON, G. S.; BAUER, E. A.; HOEFFLER, W. K.: Gamma 2 chain of laminin-5 is recognized by monoclonal antibody GB3. *J.Invest Dermatol.* 105 (1995), 648-652
80. MINER, J. H.; LEWIS, R. M.; SANES, J. R.: Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J.Biol.Chem.* 270 (1995), 28523-28526
81. MINER, J. H.; PATTON, B. L.; LENTZ, S. I.; GILBERT, D. J.; SNIDER, W. D.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; SANES, J. R.: The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J.Cell Biol.* 137 (1997), 685-701
82. MIZUSHIMA, H.; KOSHIKAWA, N.; MORIYAMA, K.; TAKAMURA, H.; NAGASHIMA, Y.; HIRAHARA, F.; MIYAZAKI, K.: Wide distribution of laminin-5 gamma 2 chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res* 50 Suppl 2 (1998), 7-14
-

-
83. NAND, K.; SCHUGER, R.; SCHUGER, L. (1999) Basement membranes in development. *Pediatric and Developmental Pathology*, pp. 103-118.
 84. NISSINEN, M.; VUOLTEENAHO, R.; BOOT, H. R.; KALLUNKI, P.; TRYGGVASON, K.: Primary structure of the human laminin A chain. Limited expression in human tissues. *Biochem.J.* 276 (1991), 369-379
 85. ODERMATT, B.; LANG, A.; RUTTNER, J.; WINTERHALTER, K.; TRUEB, B.: Monoclonal antibodies to human type IV collagen: useful reagents to demonstrate the heterotrimeric nature of the molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984), 7343-7
 86. OGATA, T.; HONGFANG, Y.; KAYANO, T.; HIRAI, K.: No significant role of Epstein-Barr virus in the tumorigenesis of Warthin tumor. *J.Med.Dent.Sci.* 44 (1997), 45-52
 87. POLETTE, M.; THIBLET, J.; PLOTON, D.; BUISSON, A. C.; MONBOISSE, J. C.; TOURNIER, J. M.; BIREMBAUT, P.: Distribution of $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 3(\text{IV})$ chains of type IV collagen in lung tumours. *J.Pathol.* 182 (1997), 185-191
 88. PULKKINEN, L.; CHRISTIANO, A. M.; GERECKE, D.; WAGMAN, D. W.; BURGESSON, R. E.; PITTELKOW, M. R.; UITTO, J.: A homozygous nonsense mutation in the beta 3 chain gene of laminin 5 (LAMB3) in Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics* 24 (1994), 357-360
 89. PYKE, C.; ROMER, J.; KALLUNKI, P.; LUND, L. R.; RALFKIAER, E.; DANO, K.; TRYGGVASON, K.: The gamma 2 chain of kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *Am.J.Pathol.* 145 (1994), 782-791
 90. RICHARDS, A.; AL IMARA, L.; POPE, F. M.: The complete cDNA sequence of laminin alpha 4 and its relationship to the other human laminin alpha chains. *Eur.J.Biochem.* 238 (1996), 813-821
 91. ROUSSELLE, P.; AUMAILLEY, M.: Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J.Cell Biol.* 125 (1994), 205-214
 92. ROUSSELLE, P.; KEENE, D. R.; RUGGIERO, F.; CHAMPLAUD, M. F.; REST, M.; BURGESSON, R. E.: Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J.Cell Biol.* 138 (1997), 719-728

-
93. ROUSSELLE, P.; LUNSTRUM, G. P.; KEENE, D. R.; BURGESSON, R. E.: Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J.Cell Biol.* 114 (1991), 567-576
 94. RYAN, M. C.; CHRISTIANO, A. M.; ENGVALL, E.; WEWER, U. M.; MINER, J. H.; SANES, J. R.; BURGESSON, R. E.: The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol.* 15 (1996), 369-381
 95. SANES, J.; CHIU, A.: The basal lamina of the neuromuscular junction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2 (1983), 667-78
 96. SANES, J. R.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R.; HUNTER, D. D.: Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J.Cell Biol.* 111 (1990), 1685-1699
 97. SANES, J. R.; HALL, Z. W.: Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. *J.Cell Biol.* 83 (1979), 357-370
 98. SASAKI, M.; KLEINMAN, H. K.; HUBER, H.; DEUTZMANN, R.; YAMADA, Y.: Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J.Biol.Chem.* 263 (1988), 16536-16544
 99. SEGAMI, N.; FUKUDA, M.; MANABE, T.: Immunohistological study of the epithelial components of Warthin's tumor. *Int J Oral Maxillofac Surg* 18 (1989), 133-7
 100. SEIFERT, G. (1991) *WHO Histological typing of salivary gland tumours* (Berlin Heidelberg New York Tokyo, Springer).
 101. SEIFERT, G.; BULL, H. G.; DONATH, K.: Histologic subclassification of the cystadenolymphoma of the parotid gland. Analysis of 275 cases. *Virchows Arch.Pathol.Anat.* 388 (1980), 13-38
 102. SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G.: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103 (1986), 2787-96
 103. SKALOVA, A.; LEIVO, I.: Basement membrane proteins in salivary gland tumours. Distribution of type IV collagen and laminin. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 420 (1992), 425-431
 104. SOINI, Y.; AUTIO, H. H.: Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A study by in situ hybridization. *J.Pathol.* 170 (1993), 291-296

-
105. SOROKIN, L. M.; CONZELMANN, S.; EKBLOM, P.; BATTAGLIA, C.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R.: Monoclonal antibodies against laminin A chain fragment E3 and their effects on binding to cells and proteoglycan and on kidney development. *Exp.Cell Res.* 201 (1992), 137-144
 106. SOROKIN, S.; HOYT, R.: PAS-lead hematoxylin as a stain for small-granule endocrine cell populations in the lungs, other pharyngeal derivatives and the gut. *Anat Rec* 192 (1978), 245-59
 107. STEPHENS, L. E.; SUTHERLAND, A. E.; KLIMANSKAYA, I. V.; ANDRIEUX, A.; MENESES, J.; PEDERSEN, R. A.; DAMSKY, C. H.: Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.* 9 (1995), 1883-1895
 108. STRASSBURGER, S.; BERNDT, A.; HYCKEL, P.; KATENKAMP, D.; KOSMEHL, H.: Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem.J.* 30 (1998), 81-88
 109. TAIRA, S.; OKUDA, M.; OSATO, T.; MIZUNO, F.: [Detection of Epstein-Barr virus DNA in salivary gland tumors]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 95 (1992), 860-8
 110. TANI, T.; KARTTUNEN, T.; KIVILUOTO, T.; KIVILAAKSO, E.; BURGESSON, R. E.; SIPPONEN, P.; VIRTANEN, I.: Alpha 6 beta 4 integrin and newly deposited laminin-1 and laminin-5 form the adhesion mechanism of gastric carcinoma. Continuous expression of laminins but not that of collagen VII is preserved in invasive parts of the carcinomas: implications for acquisition of the invading phenotype. *Am.J.Pathol.* 149 (1996), 781-793
 111. TIGER, C. F.; CHAMPLAUD, M. F.; PEDROSA, D. F.; THORNELL, L. E.; EKBLOM, P.; GULLBERG, D.: Presence of laminin alpha5 chain and lack of laminin alpha1 chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J.Biol.Chem.* 272 (1997), 28590-28595
 112. TIMPL, R.: Macromolecular organization of basement membranes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8 (1996), 618-624
 113. TIMPL, R.; AUMAILLEY, M.: Biochemistry of basement membranes. *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* 18 (1989), 59-76
 114. TIMPL, R.; BROWN, J. C.: The laminins. *Matrix Biol.* 14 (1994), 275-281

-
115. TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P. G.; RENNARD, S. I.; FOIDART, J. M.; MARTIN, G. R.: Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J.Biol.Chem.* 254 (1979), 9933-9937
 116. TIMPL, R.; WIEDEMANN, H.; VAN, D., V; FURTHMAYR, H.; KUHN, K.: A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur.J.Biochem.* 120 (1981), 203-211
 117. TRYGGVASON, K.: The laminin family. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5 (1993), 877-882
 118. TUBBS, R.; SHEIBANI, K.; WEISS, R.; LEE, V.; SEBEK, B.; VALENZUELA, R.: Immunohistochemistry of Warthin's tumor. *Am J Clin Pathol* 74 (1980), 795-7
 119. UITTO, J.; PULKKINEN, L.; CHRISTIANO, A. M.: Molecular basis of the dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen and kalinin (laminin 5) genes. *J.Invest Dermatol.* 103 (1994), 39S-46S
 120. VIRTANEN, I.; GULLBERG, D.; RISSANEN, J.; KIVILAAKSO, E.; KIVILUOTO, T.; LAITINEN, L. A.; LEHTO, V. P.; EKBLOM, P.: Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp.Cell Res.* 257 (2000), 298-309
 121. VIRTANEN, I.; LAITINEN, L.; KORHONEN, M.: Differential expression of laminin polypeptides in developing and adult human kidney. *J.Histochem.Cytochem.* 43 (1995a), 621-628
 122. VIRTANEN, I.; LOHI, J.; TANI, T.; KORHONEN, M.; BURGESSON, R. E.; LEHTO, V. P.; LEIVO, I.: Distinct changes in the laminin composition of basement membranes in human seminiferous tubules during development and degeneration. *Am.J.Pathol.* 150 (1997), 1421-1431
 123. VIRTANEN, I.; TANI, T.; BACK, N.; HAPPOLA, O.; LAITINEN, L.; KIVILUOTO, T.; SALO, J.; BURGESSON, R. E.; LEHTO, V. P.; KIVILAAKSO, E.: Differential expression of laminin chains and their integrin receptors in human gastric mucosa. *Am.J.Pathol.* 147 (1995b), 1123-1132
 124. VON DER MARK, K.; OCALAN, M.: Antagonistic effects of laminin and fibronectin on the expression of the myogenic phenotype. *Differentiation* 40 (1989), 150-157
 125. VUOLTEENAHO, R.; NISSINEN, M.; SAINIO, K.; BYERS, M.; EDDY, R.; HIRVONEN, H.; SHOWS, T. B.; SARIOLA, H.; ENGVALL, E.; TRYGGVASON, K.: Human laminin M chain (merosin): complete primary structure, chromosomal assignment, and

-
- expression of the M and A chain in human fetal tissues. *J.Cell Biol.* 124 (1994), 381-394
126. WETZELS, R. H.; ROBBEN, H. C.; LEIGH, I. M.; SCHAAFSMA, H. E.; VOOIJIS, G. P.; RAMAEKERS, F. C.: Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am.J.Pathol.* 139 (1991), 451-459
127. WEWER, U.; ALBRECHTSEN, R.; MANTHORPE, M.; VARON, S.; ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E.: Human laminin isolated in a nearly intact, biologically active form from placenta by limited proteolysis. *J.Biol.Chem.* 258 (1983), 12654-12660
128. WEWER, U.; GERECKE, D.; DURKIN, M.; KURTZ, K.; MATTEI, M.; CHAMPLIAUD, M.; BURGESSON, R.; ALBRECHTSEN, R.: Human beta 2 chain of laminin (formerly S chain): cDNA cloning, chromosomal localization, and expression in carcinomas. *Genomics* 24 (1994a), 243-52
129. WEWER, U. M.; GERECKE, D. R.; DURKIN, M. E.; KURTZ, K. S.; MATTEI, M. G.; CHAMPLIAUD, M. F.; BURGESSON, R. E.; ALBRECHTSEN, R.: Human beta 2 chain of laminin (formerly S chain): cDNA cloning, chromosomal localization, and expression in carcinomas. *Genomics* 24 (1994b), 243-252
130. WEWER, U. M.; WAYNER, E. A.; HOFFSTROM, B. G.; LAN, F.; MEYER, N. B.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.: Selective assembly of laminin variants by human carcinoma cells. *Lab Invest* 71 (1994c), 719-730

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hüllenhagen
Vorname: Thomas
Geburtsdatum/-ort: 24.04.1977, Nordhausen
Familienstand: ledig
Eltern: Günther Kurt Hüllenhagen und Doris Renate Hüllenhagen, geb. Salzmer

Schulbildung:

09/1983 - 08/1991 Polytechnische Oberschule „Karl Liebknecht“ Nordhausen
(1990 umbenannt in „Dr. Silberbordt“)
09/1991 - 06/1995 „Herder-Gymnasium“ Nordhausen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrersatzdienst:

07/1995 - 07/1996 „Neanderklinik Harzwald GmbH“ Ilfeld

Hochschulbildung:

seit 10/1996 Humanmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1998 Ärztliche Vorprüfung
09/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 – 02/2002 Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Rudolstadt
02/2002 – 05/2002 Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Chirurgie im Kreiskrankenhaus Rudolstadt
seit 06/2002 Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Orthopädie im Waldkrankenhaus "Rudolf-Elle" Eisenberg

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Hartwig Kosmehl,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 12.07.2002

Thomas Hüllenhagen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1999 bis Juli 2002 im Institut für Pathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hartwig Kosmehl durchgeführt.

Prof. Dr. Hartwig Kosmehl gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und sein reges Interesse an der Arbeit bis zur Beendigung dieser.

Im Weiteren bedanke ich mich besonders herzlich bei Frau Bergholz sowie Frau Geier aus dem pathologischen Institut für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Herrn Dr. rer. nat. habil. Alexander Berndt danke ich für die Erläuterung bezüglich der immunhistochemischen Methoden sowie der konventionellen Histologie.

Herrn K. Michael Haas möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung und Bearbeitung der Photographien danken.

Für die Unterstützung bei der Literaturrecherche danke ich Frau Gunstheimer aus der Bibliothek des Pathologischen Instituts.

Mein Dank gilt im Weiteren Prof. Ismo Virtanen für die freundliche Überlassung des Antikörpers gegen die Lamininkette $\alpha 1$ sowie Dr. Patricia Rousselle für die Antikörper gegen die Lamininketten $\alpha 3$ und $\beta 3$.